

# BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 30 MAI 2003

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS  
CONFORMÉMENT À LA  
RÈGLE 17.1.a) OU b)

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
www.inpi.fr

**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 1/2**

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 W / 192623

Réservé à l'INPI

**REMISE DES PIÈCES**

DATE **30 MAI 2002**

LIEU **75 INPI PARIS**

N° D'ENREGISTREMENT **0206631**

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE

PAR L'INPI **30 MAI 2002**

**Vos références pour ce dossier**

(facultatif) **IFB 02 AE CNR MULT**

**NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE**  
**À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE**

**GROSSET-FOURNIER & DEMACHY**  
20, rue de Maubeuge  
F-75009 Paris

**Confirmation d'un dépôt par télécopie**

☐ N° attribué par l'INPI à la télécopie

**2 NATURE DE LA DEMANDE**

Demande de brevet

Demande de certificat d'utilité

Demande divisionnaire

*Demande de brevet initiale*

*ou demande de certificat d'utilité initiale*

Transformation d'une demande de  
brevet européen *Demande de brevet initiale*

**Cochez l'une des 4 cases suivantes**

☒

☐

☐

N°

N°

☐

N°

Date

Date

Date

**3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)**

**NOUVELLES MOLECULES MULTIMERIQUES, LEUR PROCEDE DE PREPARATION,  
ET LEUR ULITISATION POUR LA PREPARATION DE MEDICAMENTS**

**4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ**

**OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE**

**LA DATE DE DÉPÔT D'UNE**

**DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE**

Pays ou organisation

Date

N°

Pays ou organisation

Date

N°

Pays ou organisation

Date

N°

☐ **S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»**

**5 DEMANDEUR**

☐ **S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»**

Nom ou dénomination sociale

Prénoms

Forme juridique

N° SIREN

Code APE-NAF

Adresse

Rue

Code postal et ville

Pays

Nationalité

N° de téléphone (facultatif)

N° de télécopie (facultatif)

Adresse électronique (facultatif)

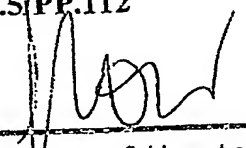

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

**3, rue Michel-Ange**

**F-75794 PARIS CEDEX 16**

**FRANCE**

**FRANCAISE**

REMISE DES PIÈCES DATE <b>30 MAI 2002</b> LIEU <b>75 INPI PARIS</b> N° D'ENREGISTREMENT <b>0206631</b> NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réservé à l'INPI	
<b>Vos références pour ce dossier :</b> <i>(facultatif)</i>		<b>IFB 02 AE CNR MULT</b>	
<b>6 MANDATAIRE</b> Nom Prénom Cabinet ou Société  N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel  Adresse Rue Code postal et ville N° de téléphone <i>(facultatif)</i> N° de télécopie <i>(facultatif)</i> Adresse électronique <i>(facultatif)</i>		<b>GROSSET-FOURNIER Chantal GROSSET-FOURNIER &amp; DEMACHY</b>  <b>20, rue de Maubeuge 75009 PARIS 01.42.81.09.58 01.42.81.08.71</b>	
<b>7 INVENTEUR (S)</b> Les inventeurs sont les demandeurs		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non <b>Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée</b>	
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b> Établissement immédiat ou établissement différé		<b>Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)</b> <input checked="" type="checkbox"/> Établissement immédiat <input type="checkbox"/> Établissement différé	
Paiement échelonné de la redevance		<b>Paiement en deux versements, uniquement pour les personnes physiques</b> <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>		<b>Uniquement pour les personnes physiques</b> <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention <i>(joindre un avis de non-imposition)</i> <input type="checkbox"/> Requête antérieurement à ce dépôt <i>(joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence)</i>	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes			
<b>10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> <i>(Nom et qualité du signataire)</i>		<b>Chantal GROSSET-FOURNIER Mandataire 422.5/PP.112</b> 	
		<b>VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI</b> 	

## NOUVELLES MOLÉCULES MULTIMÉRIQUES, LEUR PROCÉDÉ DE PRÉPARATION, ET LEUR UTILISATION POUR LA PRÉPARATION DE MÉDICAMENTS

5

L'invention a pour objet de nouvelles molécules multimériques, leur procédé de préparation, ainsi que leur utilisation pour la préparation de médicaments.

L'invention a également pour objet des molécules capables d'activer ou d'inhiber la réponse immunitaire.

10

L'importance du couple CD40/CD40L dans la réponse immunitaire a amené de nombreux groupes à utiliser des anticorps dirigés contre ces deux molécules à des fins thérapeutiques, de manière à inhiber ou activer le système immunitaire. L'administration d'anticorps anti-CD40L a donné des résultats encourageants dans le traitement de maladies auto-immunes comme l'encéphalomyélite allergique expérimentale murine (un modèle de la sclérose en plaques humaine)(Howard et al., 15 1999) ou dans le traitement de rejet d'allogreffes rénales chez les singes (Kirk et al., 1999). Dans ces deux cas, les anticorps ont inhibé une activité néfaste du système immunitaire. Inversement, l'utilisation d'anticorps anti-CD40 agonistes a permis d'une part, d'améliorer fortement la réponse à des vaccins anti-tumoraux peptidiques chez la 20 souris (Diehl et al., 1999) et d'autre part, d'augmenter l'efficacité des cellules T CD4<sup>+</sup> dans la lutte contre des tumeurs murines (Sotomayor et al., 1999 ; Lode et al., 2000). Une régression de tumeur dans des modèles murins a été mise en évidence après injection de cellules dendritiques (CDs) transformées par un adénovirus codant le CD40L (Kikuchi et al., 2000). Enfin, une activation des cellules dendritiques par 25 l'interaction de leur molécule CD40 avec CD40L est capable de protéger des souris d'une infection par un parasite, *Trypanosoma Cruzi* (Chaussabel et al., 1999). Dans tous ces travaux, la valence particulière de la molécule CD40L, qui s'associe sous forme de trimère pour former avec le CD40 des complexes hexavalents, rend difficile la production d'anticorps fonctionnels capables d'interférer avec les fonctions du couple 30 CD40/CD40L. Le développement des adénovirus codant pour CD40L répond en partie à cet inconvénient. Cependant, leur utilisation n'est pas sans poser de problèmes chez l'homme. Enfin, la valence particulière du système rend difficile la découverte de molécules de synthèse capables d'interférer avec l'interaction CD40/CD40L.

L'invention a pour but de fournir des ligands multimériques conçus pour interférer dans des interactions protéine-protéine.

La présente invention a également pour but la préparation de molécules pouvant interférer avec des interactions multivalentes protéines-protéines.

5 La présente invention a également pour but la préparation de molécules pouvant moduler l'activité des membres des familles du TNF et du TNF-R.

La présente invention a pour but de fournir une molécule de synthèse agissant sur le système CD40/CD40L.

10 La présente invention a également pour but de fournir des molécules pouvant agir comme adjuvants ou immunosuppresseurs.

La présente invention concerne une molécule multimérique capable de mimer, avec une activité agoniste ou antagoniste, un ligand multimérique protéique naturel.

15 La présente invention concerne également une molécule multimérique capable de produire des effets différents de ceux produits par le ligand multimérique naturel appartenant à la famille du TNF, pouvant être bénéfiques dans une pathologie.

Par "molécule capable de mimer un ligand avec une activité agoniste", on désigne une molécule capable de reproduire une partie ou la totalité des fonctions du ligand naturel.

20 Par "molécule capable de mimer un ligand avec une activité antagoniste", on désigne des molécules une molécule capable d'inhiber une partie ou la totalité des fonctions du ligand naturel.

Par "ligand multimérique protéique naturel", on désigne toute protéine active sur son récepteur sous forme multimérique, à savoir homo-dimérique, homo-trimérique, homo-tétramérique ou homo-oligomérique, par autoassemblage non covalent.

25 La présente invention concerne une molécule multimérique telle que définie ci-dessus, capable de mimer un ligand de récepteur de la superfamille du TNF.

La "superfamille du TNF" désigne une famille de molécules ayant des caractéristiques structurales ou fonctionnelles proches de celles du TNF, ces molécules étant essentiellement impliquées dans la réponse immunitaire.

30 Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, la molécule multimérique de l'invention est caractérisée en ce que le ligand est un ligand de la molécule CD40.

La molécule CD40 est une molécule transmembranaire de 48 kDa qui appartient à la superfamille des "récepteurs au TNF". Elle est exprimée de manière constitutive par les cellules présentatrices de l'antigène telles que les cellules dendritiques, les

monocytes et les lymphocytes B. Elle interagit de manière trivalente avec CD40L (CD154) exprimé sur les cellules T activées, les leucocytes (monocytes/macrophages, cellules NK, basophiles, éosinophiles), les plaquettes activées ainsi que sur des cellules non hématopoïétiques (cellules musculaires lisses, cellules épithéliales, cellules endothéliales). A la surface de ces différentes cellules, son expression est inductible et persistante contrairement à son expression sur les cellules T activées qui n'est que transitoire. L'interaction CD40/CD40L est centrale dans le développement et le contrôle des réponses immunitaires humorales et cellulaires.

La présente invention concerne une molécule multimérique telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce qu'elle répond à la formule générale suivante :



dans laquelle :

- n est égal à 3, 4, 5 ou 6,
- A est un groupe chimique, fonctionnalisé par au moins trois fonctions amines ou fonctions COOH,
- X représente un groupe D, B-D ou B(D)-D', dans lequel :
  - \* B est un bras espaceur,
  - \* D et D' sont des peptides ou pseudopeptides correspondant à une séquence dérivée du ligand, choisie parmi les résidus formant l'interface avec le récepteur du ligand, laquelle est susceptible d'interagir avec le récepteur.

Le groupe chimique A est un groupe chimique fonctionnalisé de telle sorte qu'il permet la liaison avec le groupe X.

Par "bras espaceur", on désigne une chaîne organique utilisée pour éloigner le groupe D à la distance désirée de A.

Par "peptides ou pseudopeptides", on désigne un enchaînement de résidus d'acides aminés naturels ou non naturels, reliés entre eux par des liaisons amide. Un pseudopeptide est obtenu par remplacement d'une ou plusieurs liaisons amide dans le peptide par une liaison chimique de nature différente.

Par "séquence dérivée du ligand, choisie parmi les résidus formant l'interface avec le récepteur du ligand", on définit une séquence peptidique appartenant à la séquence primaire du ligand et dont le nombre d'acides aminés est compris entre 3 et 10, et dont des études structurales (diffraction des rayons X, résonance magnétique nucléaire,

modélisation moléculaire, mutagenèse dirigée) ont montré qu'au moins un des acides aminés la composant est en interaction non covalente (liaison hydrogène, interaction cation-pi, pont salin, interaction hydrophobe, van der Waals) avec un résidu d'acide aminé du récepteur.

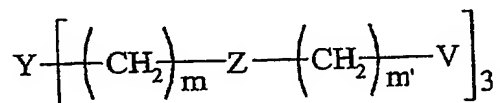
5 Une molécule multimérique avantageuse de l'invention est une molécule multimérique caractérisée en ce que A présente une symétrie  $C_3$ .

On définit une molécule de symétrie  $C_3$  de la manière suivante : une molécule appartient au groupe  $C_3$  si elle possède un axe d'ordre 3 (cf. définition dans "Physical Chemistry", PW Atkins, Oxford University Press, 1998, p430).

10 La présente invention concerne une molécule multimérique telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce que :

- soit A est un radical branché de symétrie  $C_3$  de formule générale suivante :

15

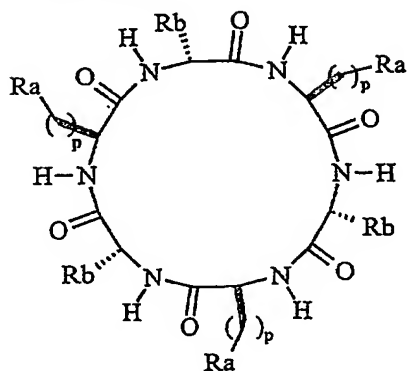


dans laquelle :

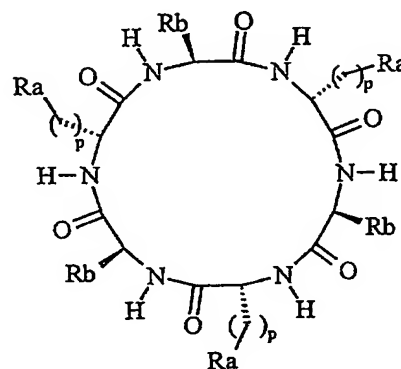
- \* m et m' sont des nombres entiers compris de 1 à 5,
- \* V représente un groupe NH ou CO formant une liaison amide avec X,
- \* Z représente un atome d'oxygène ou un groupe  $\text{CH}_2$ ,
- \* Y représente soit un atome d'azote, soit un groupe R-C soit un groupe R-CONH-C, dans lesquels R peut être un groupe alkyle avec 1 à 10 atomes de carbone, un groupe alkényle avec 1 à 10 atomes de carbone, un groupe alkynyle avec 1 à 10 atomes de carbone, un groupe aryle avec 5 à 12 atomes de carbone, un groupe aralkyle avec 5 à 14 atomes de carbone ou un groupe hétéroaryle avec 1 à 10 atomes de carbone, lesdits groupes pouvant être non substitués ou substitués par 1 jusqu'à 6 substituants choisis parmi les groupes  $\text{COOH}$ ,  $\text{NH}_2$ ,  $\text{CONH}_2$  ou alkoxy,

30

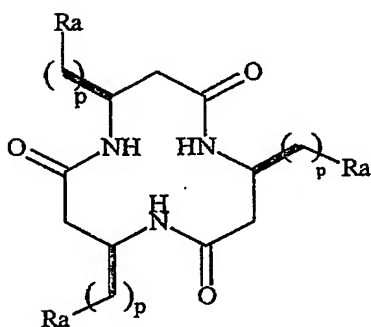
- soit A est un radical  $C_3$  cyclique répondant à l'une des formules générales suivantes :



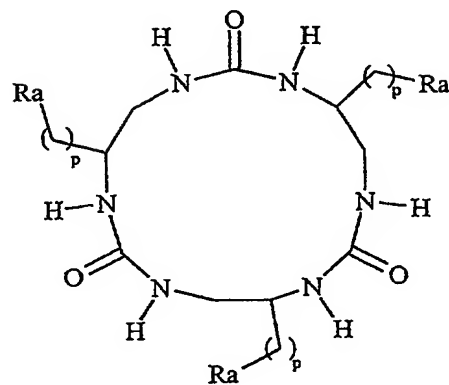
Ia



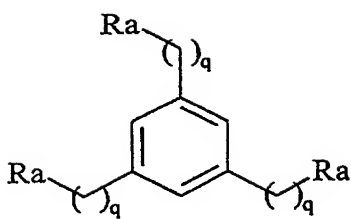
Ib



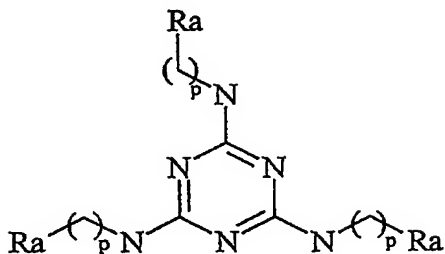
II



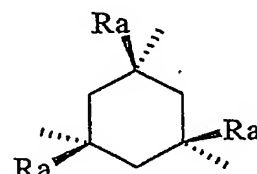
III



IV



V



VI

dans lesquelles :

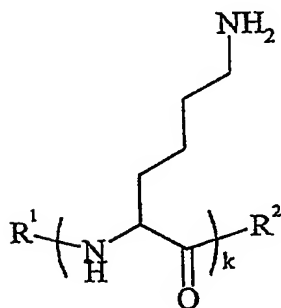
- \*  $R_a$  représente soit un groupe NH soit un groupe CO formant une liaison amide avec X,
- \*  $R_b$  représente la chaîne latérale d'un acide aminé protéinogénique,



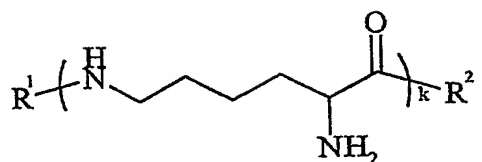
\* p est un nombre entier compris de 1 à 4,

\* q est un nombre entier compris de 0 à 4,

- soit A est un radical branché non symétrique répondant aux formules  
générales suivantes :



VII



VIII

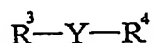
dans lesquelles :

\* k représente 3, 4, 5 ou 6,

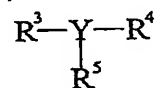
\*  $\text{R}^1$  représente soit un atome d'hydrogène, soit un résidu d'acide aminé choisi parmi les acides aminés protéinogéniques, soit un groupement  $\text{RCO}$ ,  $\text{ROCO}$  ou  $\text{RNHCO}$ , R étant tel que défini ci-dessus,

\*  $\text{R}^2$  représente soit un groupe  $\text{NH}_2$ , soit un groupe  $\text{NHR}$ , soit un résidu d'acide aminé choisi parmi les acides aminés protéinogéniques, R étant tel que défini ci-dessus,

— B répond à l'une des formules générales suivantes :



ou



dans lesquelles :

\* Y représente une chaîne alkyle  $\text{C}_1\text{-C}_{10}$  ou un groupement alkynyle ou alkenyle ou aryle ou aralkyle ou hétéroaryle,

\*  $\text{R}^3$  représente soit un groupe  $-\text{NH}$  lorsque V ou  $\text{R}_a$  est un groupe  $\text{CO}$ , soit un groupe  $\text{CO}$  lorsque V ou  $\text{R}_a$  est un groupe  $-\text{NH}$ ,

\*  $\text{R}^4$  et  $\text{R}^5$  représentent indépendamment l'un de l'autre un groupe  $\text{CO}$  ou un groupe  $\text{NH}$ ,

- D et D' sont des peptides ou pseudopeptides correspondant à une séquence dérivée du ligand qui est en interaction avec le récepteur.

La présente invention concerne également une molécule telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce que D et D' représentent des résidus dérivés du ligand du récepteur CD40 humain ou murin (CD40L), choisis parmi les suivants :

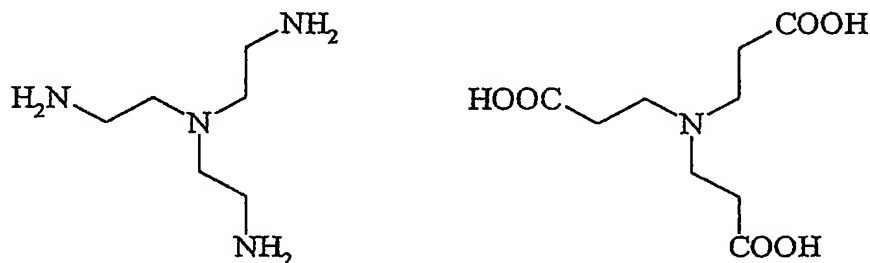
Lys<sup>143</sup>-Gly-Tyr<sup>145</sup>, Tyr<sup>145</sup>-Gly-Lys<sup>143</sup>,  
 Lys<sup>143</sup>-Gly-Tyr-Tyr<sup>146</sup>, Tyr<sup>146</sup>-Tyr-Gly-Lys<sup>143</sup>,  
 Lys-Pro-Arg, Lys-ψ(CH<sub>2</sub>NH)Pro-Arg,  
 Arg<sup>200</sup>-Phe-Glu-Arg-Ile-Leu-Leu-Arg<sup>207</sup>,  
 Arg<sup>207</sup>-Leu-Leu-Ile-Arg-Glu-Phe-Arg<sup>200</sup>,  
 Arg<sup>200</sup>-Phe-Glu-Arg-Ile<sup>204</sup>, Ile<sup>204</sup>-Arg-Glu-Phe-Arg<sup>200</sup>,  
 Arg<sup>203</sup>-Ile-Leu-Leu-Arg<sup>207</sup>, Arg<sup>207</sup>-Leu-Leu-Ile-Arg<sup>203</sup>,  
 Cys<sup>218</sup>-Gly-Gln-Gln-Ser-Ile<sup>223</sup>, Ile<sup>223</sup>-Ser-Gln-Gln-Gly-Cys<sup>218</sup>,  
 Gly<sup>200</sup>-Ser-Glu-Arg-Ile-Leu-Leu-Lys<sup>207</sup>,  
 Lys<sup>207</sup>-Leu-Leu-Ile-Arg-Glu-Ser-Gly<sup>200</sup>,  
 Gly<sup>200</sup>-Ser-Glu-Arg-Ile<sup>204</sup>, Ile<sup>204</sup>-Arg-Glu-Ser-Gly<sup>200</sup>,  
 Arg<sup>203</sup>-Ile-Leu-Leu-Lys<sup>207</sup>, Lys<sup>207</sup>-Leu-Leu-Ile-Arg<sup>203</sup>,  
 Cys<sup>218</sup>-Glu-Gln-Gln-Ser-Val<sup>223</sup>, Val<sup>223</sup>-Ser-Gln-Gln-Glu-Cys<sup>218</sup>,

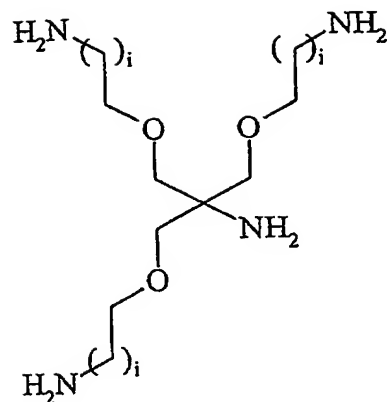
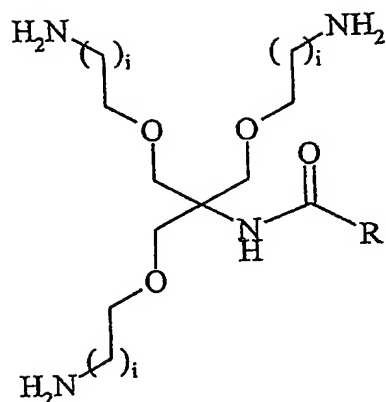
ou parmi des peptides hybrides constitués d'au moins deux acides aminés consécutifs de deux des séquences définies ci-dessus, notamment les peptides de séquences Arg<sup>203</sup>-Ile<sup>204</sup>-Tyr<sup>145</sup>-Tyr<sup>146</sup> ou Arg<sup>203</sup>-Ile<sup>204</sup>-Tyr<sup>146</sup>-Tyr<sup>145</sup>-Gly<sup>144</sup>-Lys<sup>143</sup>,

ou parmi des fragments des séquences susmentionnées,

les acides aminés pouvant être indifféremment de configuration L ou D.

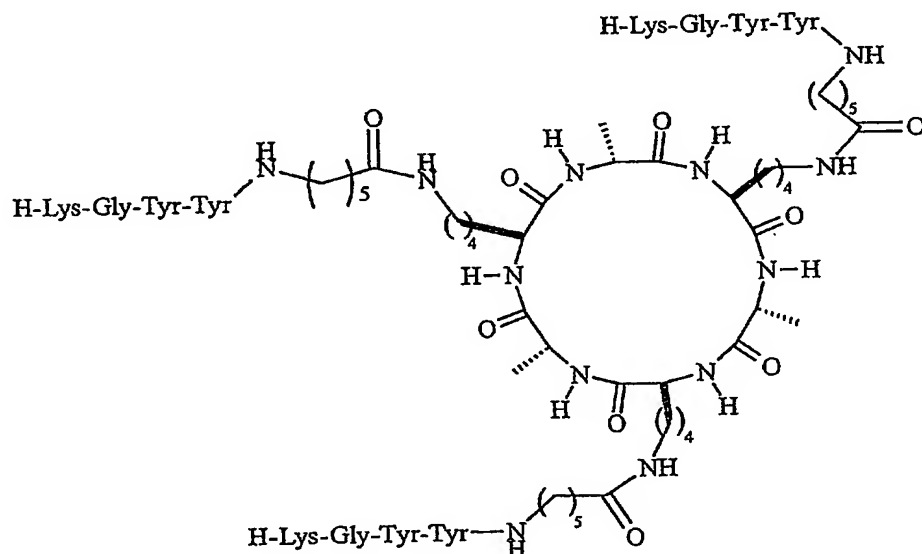
Selon un mode de réalisation avantageux de la présente invention, la molécule telle que définie ci-dessus est caractérisée en ce que A répond à l'une des formules suivantes :



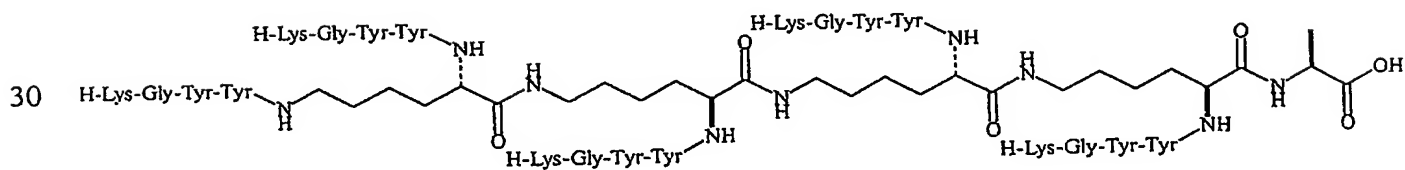


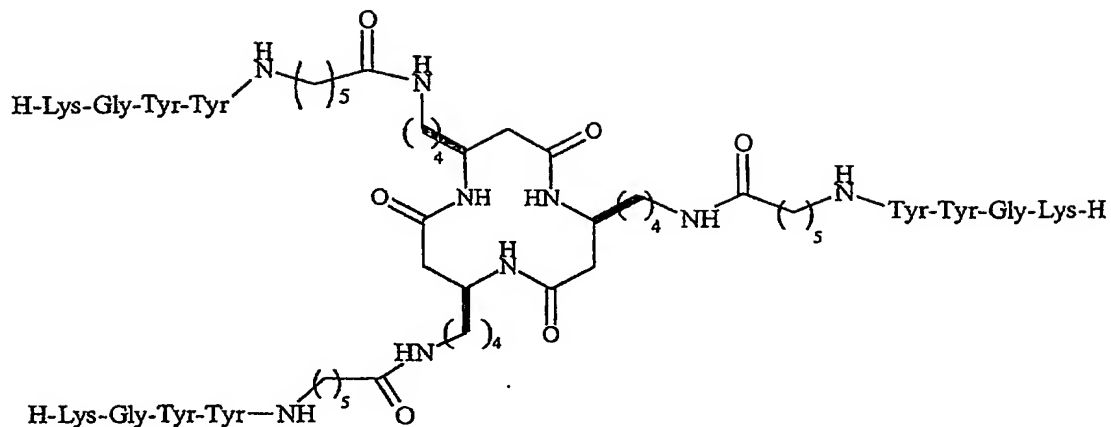
dans lesquelles  $i$  représente un nombre entier supérieur ou égal à 1.

Une molécule avantageuse de la présente invention est une molécule telle que définie ci-dessus, de formule suivante :

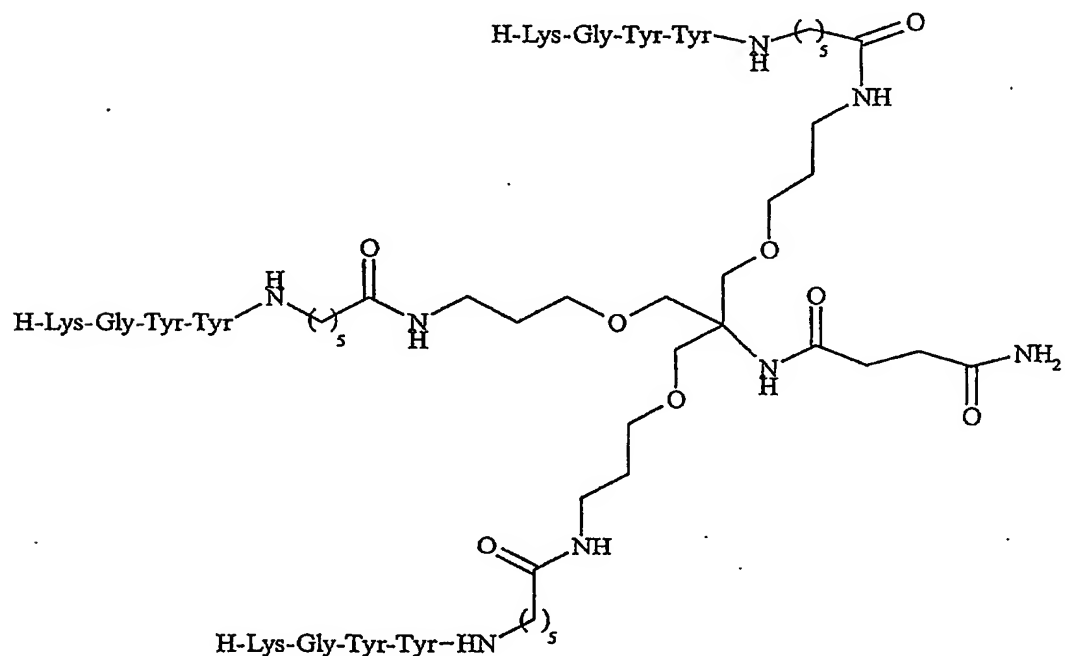


Ic





IIa



La présente invention concerne également une composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend, à titre de substance active une molécule multimérique telle que définie ci-dessus, en association avec un vecteur pharmaceutiquement acceptable.

La présente invention concerne également une composition vaccinale, caractérisée en ce qu'elle comprend, à titre de substance active une molécule multimérique telle que définie ci-dessus, en association avec un adjuvant pharmaceutiquement acceptable.

La présente invention concerne également l'utilisation de molécules multimériques telles que définies ci-dessus, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies impliquant l'inhibition ou l'activation de la réponse immunitaire.

5 La réponse immunitaire doit être inhibée au cours des maladies inflammatoires (rhumatismes inflammatoires), des maladies auto-immunes, des réactions d'hypersensibilités en général et des allergies en particulier, des rejets de greffes, des réactions du greffon contre l'hôte.

10 La réponse immunitaire doit être activée dans les vaccinations en général, dans l'immunothérapie des cancers, dans les maladies bactériennes ou virales induisant une immunosuppression (rougeole, SIDA, virus de l'herpes, cytomégalo virus...).

La présente invention concerne également l'utilisation telle que mentionnée ci-dessus, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies impliquant l'inhibition de la réponse immunitaire, telles que les rejets de greffes ou les maladies auto-immunes.

15 Les maladies impliquant l'inhibition de la réponse immunitaire comprennent les maladies auto-immunes telles que les diabètes, la sclérose en plaques, le lupus érythémateux disséminé ou l'arthrite rhumatoïde, les rejets de greffes, notamment dans le cadre d'allogreffes, de xéno greffes ou les réactions du greffon contre l'hôte, ainsi que les réactions d'hypersensibilités telles que les allergies, notamment le rhume des foins et les dermatites atopiques, ou les granulomes.

20 Les composés selon la présente invention, utilisés dans le cadre de l'inhibition de la réponse immunitaire, peuvent être administrés par voie intraveineuse, par les voies muqueuses (orales, aériennes, nasales, vaginales), par voie sous-cutanée, intradermique ou épicutanée.

25 La présente invention concerne également une composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend un composé selon la présente invention, pour le traitement de pathologies impliquant l'inhibition de la réponse immunitaire, lequel composé est présent dans la composition pharmaceutique en quantités telles qu'il peut être administré à raison d'environ 100 ng à environ 5 mg par jour et par individu.

30 La présente invention concerne également l'utilisation telle que définie ci-dessus, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies impliquant l'augmentation de la réponse immunitaire, telles que les cancers ou les infections parasitaires, bactériennes ou virales.

Les cas impliquant l'activation de la réponse immunitaire comprennent les vaccinations en général, notamment les vaccins contre la grippe ou contre les maladies infantiles, l'immunothérapie des cancers, notamment dans le cadre de mélanomes ou de cancers à métastases, ou les maladies bactériennes ou virales induisant une immunosuppression, notamment dans le cadre de la rougeole, du SIDA, du virus de l'herpès ou du cytomégalovirus.

Les composés selon la présente invention, utilisés dans le cadre de l'activation de la réponse immunitaire, peuvent être administrés par voie intraveineuse, par les voies muqueuses (orales, aériennes, nasales, vaginales), par voie sous-cutanée, intradermique ou épicutanée.

La présente invention concerne également une composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend un composé selon la présente invention, pour le traitement de pathologies impliquant l'activation de la réponse immunitaire, lequel composé est présent dans la composition pharmaceutique en quantités telles qu'il peut être administré à raison d'environ 100 ng à environ 5 mg par jour et par individu.

La présente invention concerne également l'utilisation telle que définie ci-dessus, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de maladies non liées au système immunitaire, telles que les lymphomes, l'athérosclérose ou les thromboses.

La présente invention concerne un procédé de préparation sur support solide d'une molécule multimérique telle que définie ci-dessus, dans laquelle A est un radical  $C_3$  cyclique et répond à l'une des formules Ia, Ib ou II telles que définies ci-dessus, ledit procédé étant caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- la formation d'un précurseur linéaire de A, lequel précurseur est constitué d'un enchaînement d'acides aminés formant une chaîne peptidique en croissance, synthétisée par des cycles successifs de couplage entre des résidus d'acides aminés N-protégés, dont trois portent un groupe  $R_a$  de type amine, et la fonction amine de la chaîne peptidique en croissance, et de déprotection, le premier résidu d'acide aminé étant accroché sur un support solide,

- la cyclisation du précurseur linéaire de A protégé susmentionné,
- le clivage des susdits groupes protecteurs, pour libérer les susdites fonctions amines protégées,

- le couplage des trois fonctions amines libérées avec un bras espaceur B N-protégé,

– la déprotection du bras espaceur B et le couplage des fonctions amines libérées du bras espaceur B, avec un peptide D déjà formé ou formé in situ par l'assemblage séquentiel des résidus d'acides aminés correspondant au peptide D, et

– le clivage de la molécule du support solide, après la suppression de tous les groupements protecteurs présents sur les chaînes latérales fonctionnalisées du peptide D, afin d'obtenir la molécule multimérique selon l'invention.

Les composés comprenant un groupe A cyclique présentant une symétrie  $C_3$  et répondant aux formules générales Ia, Ib ou II, sont obtenus par synthèse sur support solide selon le procédé décrit ci-après. Le groupe A est d'abord construit sur support solide par synthèse de son précurseur linéaire et cyclisation. Ainsi, un premier résidu d'acide aminé, dont la fonction acide est convenablement protégée (ester d'allyle par exemple), est accroché sur le support par une réaction d'amination réductrice, en utilisant une résine fonctionnalisée par un aldéhyde (résines commerciales). Le précurseur linéaire de A est ensuite assemblée par cycles successifs de couplage (de manière classique en synthèse de peptide) avec un acide aminé N-protégé (N-Fmoc-Xaa-OH par exemple, Xaa représentant un acide aminé ou un peptide en croissance quelconque) et de déprotection (pipéridine 20% dans du DMF pour le clivage d'un groupe Fmoc). Les techniques de lavage et de filtration de la résine ainsi que de déprotection du groupement Fmoc sont celles couramment utilisées en synthèse peptidique en phase solide. Les trois acides aminés portant une chaîne  $R_a$  (cf. formules Ia, Ib ou II) sont fonctionnalisés sur leur chaîne latérale par une fonction amine qui est protégée par un groupement protecteur orthogonal aux autres (TEOC ou méthyltrityl par exemple). A la fin de l'assemblage, le dernier groupement N-protecteur est clivé (en présence de pipéridine 20% dans du DMF dans le cas d'un groupement Fmoc) et la protection de l'ester C-terminal est clivée. Le précurseur linéaire est alors cyclisé "tête à queue" ("head to tail") en présence d'un réactif de couplage (classique en synthèse peptidique) et d'une base tertiaire comme la DIEA ou la collidine par exemple. La réaction de cyclisation peut être suivie par un test colorimétrique tel que le test de Kaiser (Kaiser et al., 1970). A la fin de la cyclisation, les groupements protecteurs des acides aminés possédant une fonction amine protégée sont clivés et le bras espaceur, convenablement protégé (Fmoc-Ahx (acide 6-amino hexanoïque)-COOH par exemple), est couplé en présence d'un agent de couplage sur les trois fonctions amines libres. A l'issue de ce couplage, le groupement protecteur du bras espaceur est clivé et le peptide D est assemblé par des méthodes classiques de synthèse peptidique. A la fin de la

synthèse et une fois le dernier groupe protecteur enlevé, la molécule est clivée de la résine, par exemple par traitement à l'acide trifluoroacétique, lyophilisée après précipitation à l'éther et purifiée par HPLC préparative en phase inverse sur une colonne C18 par exemple.

5 La présente invention concerne un procédé de préparation d'une molécule multimérique telle que définie ci-dessus, dans laquelle A est un radical C<sub>3</sub> branché et répond à l'une des formules IV, V ou VI telles que définies ci-dessus, ledit procédé étant caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

10 – le couplage des trois fonctions amines du radical A de formule IV, V ou VI avec un bras espaceur B protégé,

– la déprotection du bras espaceur B,

– l'assemblage du bras espaceur B déprotégé avec des acides aminés protégés entrant dans la constitution d'un peptide D, par des cycles successifs de couplage, de purification et de déprotection des acides aminés susmentionnés,

15 – la déprotection du dernier acide aminé entrant dans la constitution du peptide D, afin d'obtenir la molécule multimérique selon l'invention.

Les composés de l'invention comprenant un groupe A qui est un radical branché de symétrie C<sub>3</sub>, et correspondant notamment aux formules IV à VI, peuvent être synthétisés en phase solide ou en solution selon la procédure détaillée ci-après.

20 Lorsque le radical A est fonctionnalisé par des fonctions amines, le bras espaceur convenablement protégé (Boc-Ahx-OH par exemple) est couplé en présence d'un réactif de couplage selon les procédés de synthèse peptidique sur les trois fonctions amines de A. A l'issue de ce couplage dont la réaction peut être suivie par chromatographie sur couche mince, le produit est isolé et purifié sur colonne de silice selon les techniques  
25 classiques de synthèse organique. Le groupement Boc est ensuite clivé par l'acide trifluoroacétique, et le peptide D est assemblé en solution par étapes successives de couplage, purification et déprotection du groupement Boc. A la fin de la synthèse, les groupements protecteurs sur les chaînes latérales sont clivés par hydrogénation catalytique ou bien par traitement à l'acide fluorhydrique HF. La molécule trimérique  
30 est ensuite purifiée par HPLC préparative en phase inverse sur une colonne C18 par exemple.

Lorsque le radical A est fonctionnalisé par des fonctions acides carboxyliques, le bras espaceur convenablement protégé (hexaméthylène diamine mono protégée par un groupement Boc par exemple) est couplé en présence d'un réactif de couplage selon les



procédés de synthèse peptidique sur les trois fonctions acide carboxylique de A. A l'issue de ce couplage dont la réaction peut être suivie par chromatographie sur couche mince, le produit est isolé et purifié sur colonne de silice selon les techniques classiques de synthèse organique. Le groupement Boc est ensuite clivé par l'acide trifluoroacétique, et le peptide D est assemblé en solution par étapes successives de couplage, purification et déprotection du groupement Boc. A la fin de la synthèse, les groupements protecteurs sur les chaînes latérales sont clivés par hydrogénation catalytique ou bien par traitement à l'acide fluorhydrique HF. La molécule trimérique est ensuite purifiée par HPLC préparative en phase inverse sur une colonne C18 par exemple.

La présente invention concerne un procédé de préparation sur support solide d'une molécule multimérique telle que définie ci-dessus, dans laquelle A est un radical branché non symétrique répondant à l'une des formules VII ou VIII telles que définies ci-dessus, ledit procédé étant caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

– le greffage d'une lysine sur un support solide, chacune des deux fonctions amines de la lysine, respectivement en position  $\alpha$  et  $\epsilon$ , étant protégée respectivement par des groupes protecteurs différents et orthogonaux,

– l'allongement de la chaîne peptidique formée à partir de la lysine, à la longueur désirée, par couplages et déprotections successifs

\* soit uniquement des fonctions amines en position  $\alpha$  afin d'obtenir le radical A de formule VII, avec des fonctions amines protégées en position  $\epsilon$ ,

\* soit uniquement des fonctions amines en position  $\epsilon$  afin d'obtenir le radical A de formule VIII, avec des fonctions amines protégées en position  $\alpha$ ,

– le couplage des fonctions amines déprotégées en position  $\epsilon$  dans le radical A de formule VII ou en position  $\alpha$  dans le radical A de formule VIII, avec un bras B protégé,

– l'assemblage du bras espaceur B déprotégé avec un peptide D déjà formé ou formé in situ par l'assemblage séquentiel des résidus d'acides aminés correspondant au peptide D, et

– le clivage de la molécule ainsi obtenue du support solide, après la suppression de tous les groupements protecteurs présents sur les chaînes latérales fonctionnalisées du peptide D.

Les composés de l'invention comprenant un groupe A qui est un radical branché non symétrique, peuvent être synthétisés en phase solide selon la procédure détaillée ci-après.

On utilise une résine Fmoc-Xaa-Wang (Xaa peut être n'importe quel acide aminé ou peptide en croissance) ou une résine Fmoc-Rink-amide commerciale. Après clivage du groupement Fmoc avec de la pipéridine 25% dans du DMF (diméthylformamide) (2 × 15 min), l'acide aminé, portant la chaîne amine fonctionnalisée, convenablement protégée de manière orthogonale notamment par un groupement Fmoc ou un groupement Mtt (méthyltrityle) dans le cas d'une fonction amine (Fmoc-Lys(Mtt)-OH par exemple), est activé avec un agent de couplage en présence d'une base tertiaire et couplé sur la résine. Le groupement Mtt ou Fmoc est clivé sélectivement par traitement avec une solution (6 ml) de 85% de dichlorométhane (DCM), de 10% de triisopropylsilane (TIS), de 5% d'acide trifluoroacétique (TFA) (3 × 3 min) (cas du Mtt), ou de pipéridine 25% dans du DMF (cas du Fmoc). La chaîne est allongée à la longueur désirée (k étant un nombre entier compris entre 3 et 6) par couplages et déprotections successives en utilisant le même acide aminé (Fmoc-Lys(Mtt)-OH par exemple). Après déprotection du dernier groupement Fmoc ou Mtt, le reste des groupements protecteurs (Mtt ou Fmoc) est clivé et le bras espaceur convenablement protégé (Fmoc-Ahx-COOH par exemple) est couplé en présence d'un agent de couplage sur les fonctions amines libres. A l'issue de ce couplage, le groupement protecteur du bras espaceur est clivé et le peptide D est assemblé par des méthodes classiques de synthèse peptidique. A la fin de la synthèse et une fois le dernier groupe protecteur enlevé, le peptide est clivé de la résine (traitement à l'acide trifluoroacétique par exemple), lyophilisé après précipitation à l'éther et purifié par HPLC préparative en phase inverse sur une colonne C18 par exemple.

## DESCRIPTION DES FIGURES

La Figure 1A représente le modèle moléculaire du complexe trivalent CD40-CD40L.

La Figure 1B représente des résidus de CD40L situés à l'interface et essentiels à l'interaction avec CD40. Les résidus portant une étoile appartiennent à la deuxième sous-unité CD40L formant l'interface.

La Figure 2 représente la structure des ligands trimériques de l'invention.

Les Figure 3A, 3B, 3C et 3D représentent l'expression de CD95 à la surface des cellules du lymphome de Burkitt BL41 lors de l'interaction CD40-CD40L, mesurée par cytométrie de flux. Les surfaces grisées représentent le contrôle isotypique et la courbe gris clair représente la fluorescence proportionnelle à la quantité d'anti-CD95 fixé sur les cellules.

La Figure 3A représente l'expression de CD95 lorsque les cellules BL41 susmentionnées ( $5.10^5/\text{ml}$ ) sont incubées avec des fibroblastes 3T6 non transfectés.

La Figure 3B représente l'expression de CD95 lorsque les cellules BL41 susmentionnées ( $5.10^5/\text{ml}$ ) sont incubées avec des fibroblastes 3T6 transfectés par CD40L.

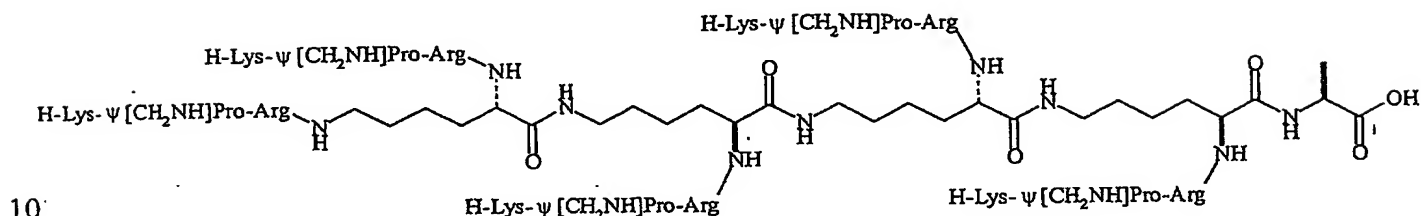
La Figure 3C représente l'expression de CD95 lorsque les cellules BL41 susmentionnées ( $5.10^5/\text{ml}$ ) sont incubées avec des fibroblastes 3T6 non transfectés, en présence d'anticorps anti-CD40L.

La Figure 3D représente l'expression de CD95 lorsque les cellules BL41 susmentionnées ( $5.10^5/\text{ml}$ ) sont incubées avec des fibroblastes 3T6 transfectés par CD40L, en présence d'anticorps anti-CD40L.

## PRÉPARATION DES COMPOSÉS L1, L2, L3 ET L4 :

### A) PRÉPARATION DU COMPOSÉ L1

5 Le composé L1 répond à la formule suivante :



Le composé L1 est synthétisé en phase solide sur une résine Wang-Ala-Fmoc commerciale sur une échelle de 200  $\mu$ mol. Après clivage du groupement Fmoc avec 25% de pipéridine dans la DMF (diméthyleformamide) ( $2 \times 15$  min), l'acide aminé Fmoc-Lys(Mtt)-OH (3 équivalents) activé avec Bop (benzotriazol-1-yloxy-tris(diméthylamino)phosphonium hexafluorophosphate)(3 équivalents), HOBt (1-hydroxybenzotriazole)(3 équivalents) et DIEA (diisopropyléthylamine)(9 équivalents) dans la DMF est couplé à la résine ( $2 \times 15$  min). Les techniques de lavage et de filtration de la résine ainsi que de déprotection du groupement Fmoc sont celles couramment utilisées en synthèse peptidique en phase solide. Le groupement Mtt (4-méthyltrityle) est clivé avec une solution (6 ml) de 85% DCM (dichlorométhane), 10% TIS (triisopropylsilane), 5% TFA (acide trifluoroacétique) ( $3 \times 3$  min). Le deuxième et le troisième Fmoc-Lys(Mtt)-OH sont couplés avec la même stratégie et les mêmes quantités de réactifs ci-dessus. La quatrième lysine est couplée sous forme de Fmoc-Lys(Fmoc)-OH. Après déprotection du groupement Fmoc avec 25% pipéridine dans la DMF ( $2 \times 15$  min), les acides aminés Fmoc-Arg(Pbf)-OH et Fmoc-Pro-OH (15 équivalents) activés avec Bop (15 équivalents), HOBt (15 équivalents) et DIEA (45 équivalents) dans la DMF sont couplés pendant 15 minutes (chaque couplage est répété 2 fois). La liaison amide réduite entre la lysine et la proline est formée sur la résine en utilisant la réaction d'amination réductrice de l'aldéhyde Boc-Lys(Boc)-CHO (2,5 équivalents) en présence de  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  (2,5 équivalents) dans de la DMF contenant 1% d'acide acétique ( $2 \times 1$ h). Le produit est clivé de la résine avec une solution (5 ml) de 80% TFA, 10% DCM, 10% TIS pendant 2 heures. Après précipitation dans de l'éther froid, le produit brut est

15

20

25

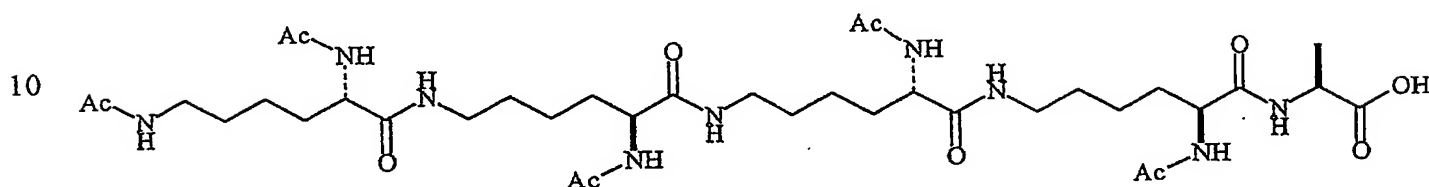
30

lyophilisé dans un mélange H<sub>2</sub>O/acétonitrile/acide acétique (80/15/5). Le produit est contrôlé par spectrométrie de masse (MALDI-MS (Matrix assisted laser desorption ionisation mass spectrometry)) et HPLC analytique et purifiée par HPLC préparatif sur colonne C<sub>18</sub> en utilisant un gradient d'acétonitrile dans l'eau.

5

## B) PRÉPARATION DU COMPOSÉ L2

Le composé L2 répond à la formule suivante :



Le composé L2 est synthétisé comme L1 jusqu'à la quatrième lysine. Après déprotection du groupement Fmoc avec 25% de pipéridine dans la DMF (2 × 15 min), les groupes aminés libres sont acétylés avec une solution d'anhydride acétique (1 ml) dans du DCM (2 ml) en présence de DIEA (1 ml) pendant 15 minutes. Le produit est clivé de la résine avec une solution (5 ml) de 80% TFA, 10% DCM, 10% TIS pendant 2 heures. Après précipitation dans de l'éther froid, le produit brut est lyophilisé dans un mélange H<sub>2</sub>O/acétonitrile/acide acétique (80/15/5). Le produit est contrôlé par spectrométrie de masse (MALDI-MS) et HPLC analytique et purifiée par HPLC préparatif sur colonne C<sub>18</sub> en utilisant un gradient d'acétonitrile dans l'eau.

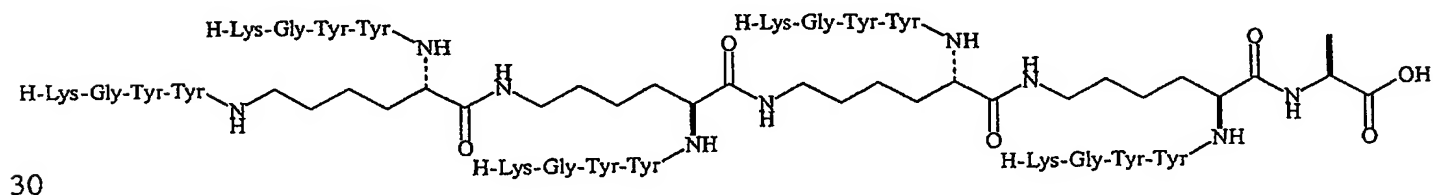
15

20

## C) PRÉPARATION DU COMPOSÉ L3

Le composé L3 répond à la formule suivante :

25

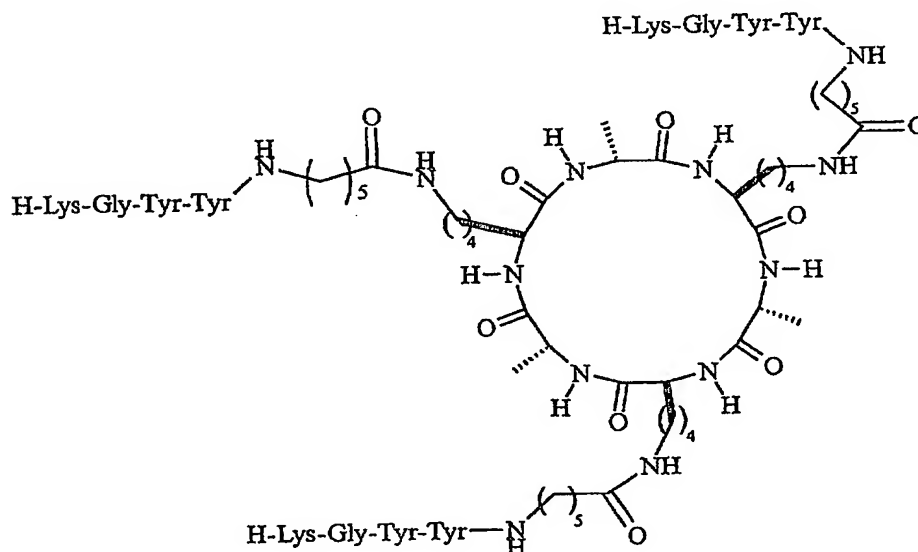


Le composé L3 est synthétisé comme L1 jusqu'à la quatrième lysine. Après déprotection du groupement Fmoc avec 25 % pipéridine dans la DMF (2 × 15 min), les acides aminés Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH et Fmoc-

Lys(Boc)-OH (15 équivalents) activés avec Bop (15 équivalents), HOBt (15 équivalents) et DIEA (45 équivalents) dans la DMF sont couplés pendant 15 minutes (chaque couplage est répété 2 fois). Le produit est clivé de la résine avec une solution (5 ml) de 80% TFA, 10% DCM, 10% TIS pendant 2 heures. Après précipitation dans de l'éther froid, le produit brut est lyophilisé dans un mélange H<sub>2</sub>O/acétonitrile/acide acétique (80/15/5). Le produit est contrôlé par spectrométrie de masse (MALDI-MS) et HPLC analytique et purifiée par HPLC préparatif sur colonne C<sub>18</sub> en utilisant un gradient d'acétonitrile dans l'eau.

#### D) PRÉPARATION DU COMPOSÉ L4

Le composé L4 répond à la formule suivante :



##### 1) Préparation des synthons

###### a) Boc-(D)Ala-OAll

L'acide aminé Boc-D-Ala-OH (1,89 g, 10 mmol) est solubilisé dans 70 ml d'ACN (acétonitrile) et la solution refroidie à 0°C. Après avoir ajouté 1,5 ml (1,2 équivalents) de DBU (1,8-diazabicyclo[5,4,0]undécen-7-ène), une solution de bromure d'allyle (0,72 ml, 1 équivalent), dans 10 ml d'acétonitrile, est ajoutée goutte à goutte pendant environ 15 minutes. La réaction, suivie par chromatographie en couche mince (CCM) se déroule à température ambiante pendant 21 heures. Après évaporation de l'acétonitrile, le

produit brut est dissous dans l'acétate d'éthyle et la solution organique est lavée avec  $\text{NaHCO}_3$  5%,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KHSO}_4$  1N et  $\text{H}_2\text{O}$ . Après séchage sur  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  et évaporation de la phase organique, le produit est récupéré sous forme d'huile avec un rendement de 73%. Le produit est caractérisé par spectroscopie RMN et FT-IR, et utilisé pour la réaction suivante sans purifications ultérieures.

#### b) $\text{HCl} \times \text{H-(D)Ala-OAll}$

L'acide aminé Boc-D-Ala-OAll (1,67 g ; 7,3 mmol) est solubilisé dans une solution de 5 ml de HCl (4 M) dans du dioxane sous atmosphère d'argon pendant 30 minutes. La réaction est suivie par CCM. Après évaporation de la solution acide, le produit est obtenu solide sous vide avec un rendement de 90%. Le produit est caractérisé par spectroscopie RMN et FT-IR, et utilisé pour la réaction suivante sans purifications ultérieures.

#### c) Fmoc-Lys(Mtt)-OAll

L'acide aminé Fmoc-Lys(Mtt)-OH (625 mg, 1 mmol) est solubilisé dans 5 ml de dichlorométhane (DCM) en présence de HOBt (1 équivalent) et  $\text{EDC} \times \text{HCl}$  ( $\text{EDC}$  : 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide méthiodide)(1,1 équivalents). Après 5 minutes, l'allyle alcool (1 équivalent) et la DMAP (4-diméthyl aminopyridine)(0,1 équivalents) sont ajoutés. Après 27 heures, 0,5 équivalents de HOBt,  $\text{EDC} \times \text{HCl}$ , allyle alcool et 0,1 équivalents de DMAP sont ajoutés. La réaction se déroule au total pendant 44 heures. Après évaporation du dichlorométhane, le produit brut est dissous dans l'acétate d'éthyle et la solution organique est lavée avec  $\text{NaHCO}_3$  5%,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KHSO}_4$  1N et  $\text{H}_2\text{O}$ . Après séchage sur  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  et évaporation de la phase organique, le produit est récupéré su forme d'huile avec un rendement de 94%. Le produit est caractérisé par spectroscopie RMN et FT-IR, et utilisé pour la réaction suivante sans purifications ultérieures.

#### d) H-Lys(Mtt)-OAll

Fmoc-Lys(Mtt)-OAll (240 mg, 0,36 mmol) est solubilisé dans 20% de DEA (diéthyle amine) dans du DCM (10 ml). La réaction, suivie par CCM, se déroule pendant 5 heures après avoir ajouté encore 3 ml de DEA. Après évaporation de la solution, le produit brut est solubilisé dans le diéthyle éther et extrait avec une solution

de  $\text{KHSO}_4$  1 N. La solution acide est basifiée avec  $\text{NaHCO}_3$  solide et le produit ré-extrait avec de l'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée avec  $\text{H}_2\text{O}$ , séchée sur  $\text{N}_2\text{SO}_4$  et évaporée. Le produit est récupéré sous forme d'huile avec un rendement quantitatif, et utilisé pour la réaction suivante.

5

## 2) Amination réductrice sur support solide

10

La réaction d'amination réductrice est effectuée en phase solide sur une résine 2-(3,5-dimethoxy-4-formylphenoxy)éthyle polystyrène commerciale, sur une échelle de 62  $\mu\text{mol}$ .  $\text{HCl} \times \text{H-D-Ala-OAll}$  (10 équivalents) et  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  (10 équivalents) sont solubilisés dans la DMF et ajoutés à la résine. La réaction, suivie par spectrophotométrie FT-IR, se déroule pendant 24 heures sous agitation.

15

## 3) Préparation du dipeptide linéaire, précurseur du L4

20

L'acide aminé Fmoc-Lys(Mtt)-OH (5 équivalents) est solubilisé dans 1 ml de dichlorométhane en présence du collidine (14 équivalents) et activé avec du triphosgène (1,65 équivalents) pendant 1 minute. La solution est ensuite ajoutée à la résine (62  $\mu\text{mol}$ ) et la réaction de couplage se déroule pendant 30 minutes. La résine est lavée de manière extensive au DCM, à la DMF et séchée à l'éther.

## 4) Préparation du tripeptide linéaire précurseur du L4

25

30

Le conjugué dipeptide-résine (62  $\mu\text{mol}$ ) est traité avec  $\text{Pd}(\text{Ph}_3)_4$  (2 équivalents), solubilisé dans 2 ml d'une solution de DCM:AcOH (acide acétique):NMM (N-méthyle morpholine) en rapport 1850:100:50 pendant 6 h sous argon. La réaction est suivie par spectrophotométrie FT-IR. Ensuite, à l'acide aminé H-Lys(Mtt)-OAll (5,8 équivalents), solubilisé dans 1,5 ml de DMF et 600  $\mu\text{l}$  de DCM, sont ajoutés HATU [O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluranium hexafluorophosphate] (4 équivalents) HOAt (7-azabenzotriazol) (4 équivalents),  $\text{CuCl}_2$  (0,5 équivalents) et collidine (9 équivalents). La solution est ajoutée à la résine (62  $\mu\text{mol}$ ) et la réaction de couplage se déroule pendant 2 heures. La résine est lavée de manière extensive à la DMF, au DCM, au méthanol, séchée à l'éther et contrôlée par spectrophotométrie FT-IR.



### 5) Préparation de l'hexapeptide cyclique L4

Après déprotection du groupement Fmoc avec 25 % de pipéridine dans la DMF (2 × 15 min), les acides aminés Fmoc-D-Ala-OH, Fmoc-Lys(Mtt)-OH et Fmoc-D-Ala-OH (5 équivalents) activés avec Bop (5 équivalents), HOBt (5 équivalents) et DIEA (15 équivalents) dans la DMF sont couplés pendant 1 heure (chaque couplage est répété 2 fois). Le groupement allyle est clivé avec  $\text{Pd}(\text{Ph}_3)_4$  (2 équivalents), solubilisé dans 2 ml d'une solution de DCM:AcOH:NMM en rapport 1850:100:50 pendant 6 h sous argon.

Le groupement Fmoc est clivé avec une solution 25% de pipéridine dans la DMF (2 × 15 min). Le dérivé hexapeptide-résine linéaire avec les extrémités N- et C-terminales libres est cyclisé en présence de HOAt (4 équivalents), DIC (diisopropylcarbodiimide) (4,4 équivalents) dans une solution de DMF/DCM 5:2 (2,1 ml) pendant 3 heures. Le groupement Mtt est clivé avec une solution (2 ml) de 85% DCM, 10% TIS, 5% TFA (3 × 2 min). Les acides aminés Fmoc-Ahx-OH (H-Ahx-OH : acide 6-amino hexanoïque), Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH et Fmoc-Lys(Boc)-OH (15 équivalents) activés avec Bop (15 équivalents), HOBt (15 équivalents) et DIEA (45 équivalents) dans la DMF sont couplés pendant 1 heure (chaque couplage est répété 2 fois). Le peptide cyclique est clivé de la résine avec une solution (3 ml) de 90% TFA, 5%  $\text{H}_2\text{O}$ , 5% TIS pendant 2 heures. Le clivage est répété une deuxième fois dans les mêmes conditions pendant 3 heures. Après précipitation dans de l'éther froid, le produit brut est lyophilisé dans un mélange  $\text{H}_2\text{O}$ /acétonitrile/acide acétique (80/15/5). Le produit est contrôlé par spectrométrie de masse (MALDI-MS) et HPLC analytique et purifiée par HPLC préparatif sur colonne  $\text{C}_{18}$  en utilisant un gradient d'acétonitrile dans l'eau.

## TESTS BIOLOGIQUES :

Ces tests s'effectuent en 3 phases. On choisit d'abord les ligands les plus intéressants par des tests simples, puis leurs effets physiologiques sont testés dans des modèles d'activations cellulaires *in vitro*. Enfin, les ligands les plus intéressants sont testés dans des modèles murins *in vivo*.

### I – SÉLECTION DES LIGANDS :

Une fois l'intégrité structurale de ces ligands analysée, leur liaison est testée sur des molécules CD40 solubles ou membranaires. Pour cela, on mesure l'inhibition de la liaison du CD40L soluble sur la molécule CD40 adsorbée à du plastique ou présentée par des cellules B normales ou transformées (lymphome de Burkitt). Cette étape est évaluée à l'aide d'un test ELISA et d'un marquage en cytométrie de flux permettant de visualiser la liaison CD40/CD40L.

Ensuite, l'affinité de ces ligands pour la molécule CD40 est évaluée à l'aide d'un biocapteur (BIAcore<sup>TM</sup>). Pour étudier l'effet agoniste ou antagoniste de ces ligands, un test basé sur un système biologique simple a été mis au point. On étudie l'expression de la molécule membranaire CD95 par des cellules B transformées (lymphomes de Burkitt) après activation par l'interaction CD40-CD40L (Schattner et al., 1996). Dans un tel modèle, le partenaire CD40L est exprimé sur des fibroblastes transfectés (3T6-CD40L)(Buelens et al., 1997). Les cellules du lymphome de Burkitt BL41 sont incubées avec des fibroblastes 3T6 non transfectés (Figures 3A et 3C) ou avec des fibroblastes 3T6 transfectés par CD40L (Figures 3B et 3D). Après 48h, l'expression de CD95 est évaluée par cytométrie de flux. L'expression de CD95 est induite en présence de CD40L (Figure 3B). Un anticorps anti-CD40L commercial inhibe les conséquences de l'interaction CD40-CD40L (Figure 3D).

L'effet agoniste des ligands est évalué par la mesure de l'expression de CD95, en cytométrie de flux, après incubation des cellules B avec les ligands de CD40. L'effet antagoniste est évalué par la mesure de la diminution de l'expression de CD95 induite par le CD40L en présence des différents ligands chimiques (voir Tableau I). Grâce à ces tests, on sélectionne les ligands les plus intéressants pour évaluer leur activité *in vivo* et *in vitro* dans des modèles plus complexes.

## A) PRINCIPE DU TEST BIOLOGIQUE

Les cellules de lymphomes B expriment la molécule CD95 lorsqu'elles reçoivent un signal par l'intermédiaire de la molécule CD40, qu'elles expriment de manière constitutive. Ce signal est généralement apporté par la molécule CD40L (CD154) exprimée par une autre cellule. Les ligands antagonistes inhibent la liaison de CD40 sur CD40L et bloquent donc l'expression de CD95. Les ligands agonistes miment la molécule CD40L et induisent l'expression de CD95 même en absence de la cellule exprimant CD40L.

### Mode opératoire

Les cellules du lymphome de Burkitt BL41 ( $5 \cdot 10^5/\text{ml}$ ) sont cultivées en présence de fibroblastes 3T6 ( $10^5/\text{ml}$ ) transfectés (3T6-CD40L) ou non avec CD40L (3T6), et traitées à la mitomycine pour arrêter leur prolifération. Les ligands sont ajoutés au début de la culture à la concentration désirée. Après 48h de culture, l'expression de la molécule CD95 est mesurée en cytométrie de flux. Les cellules BL41 sont distinguées des fibroblastes en utilisant un anticorps anti-CD19 (marqueur spécifique des cellules B).

### Résultats

Les cellules BL41 cultivées en présence des cellules 3T6 n'expriment pas la molécule CD95 (Figure 3A). Par contre, l'expression de CD95 est induite à la surface des cellules BL41 en présence de cellules 3T6-CD40L (Figure 3B). Un anticorps anti-CD40L commercial, qui bloque l'interaction CD40/CD40L, inhibe complètement l'expression de CD95 induite sur les cellules BL41 en présence des cellules 3T6-CD40L (Figure 3D).

L'expression de CD95 est inhibée par le ligand L1 à 100 et 50  $\mu\text{M}$  (Tableau 1). Le ligand L3, qui a la même structure cœur que L1, mais qui présente une séquence en acides aminés différente inhibe fortement l'expression de CD95 induite par CD40L de 100 à 25  $\mu\text{M}$ . Le ligand L2, qui correspond à la structure cœur des ligands L1 et L3, n'a aucun effet sur l'expression de CD95. Enfin, Le ligand à structure cœur cyclique L4 inhibe l'expression de CD95 induite par CD40L à 10 et 5  $\mu\text{M}$ . Son activité est donc environ 10 fois plus importante que pour le ligand linéaire qui présente le même peptide (L3).

Tableau I

% d'inhibition de l'expression de CD95 induite par CD40L après traitement avec				
	L1	L2	L3	L4
100 $\mu$ M	60	0	60	
50 $\mu$ M	43	0	62	
25 $\mu$ M	0	0	25	
10 $\mu$ M			13	40
5 $\mu$ M			0	30
2,5 $\mu$ M				0
1 $\mu$ M				0

5

### B) ÉTUDE DE L'INTERACTION ENTRE LE CD40 ET LE CD40L ET LES PEPTIDES L1 à L4 :

#### Principe de la méthode

10 Le Biacore3000 est un appareil qui permet l'étude des interactions entre deux molécules, basé sur la résonance plasmonique de surface. Il permet de mesurer en temps réel, et donc de suivre les cinétiques d'interaction (association et dissociation) d'un analyte (qui se trouve dans une solution injectée) et d'un ligand (immobilisé sur une micropuce supportant la mesure). Les mesures cinétiques à différentes concentrations

15 d'analyte permettent de calculer les constantes d'affinités de l'interaction entre le ligand et les analytes. La micropuce contient quatre cellules de mesure différentes, ce qui permet de comparer directement une cellule de référence sur laquelle une protéine non-pertinente (protéine qui n'a aucune affinité avec le ligand étudié), mais proche du ligand est immobilisée avec la cellule sur laquelle le ligand est immobilisé.

20

### Mode opératoire

Sur une micropuce ont été immobilisés des anticorps de lapin dirigés contre la partie constante d'immunoglobulines de souris. Dans la cellule de référence on immobilise avec un flux de 5  $\mu\text{L}/\text{min}$  durant 2 minutes un anticorps monoclonal de souris d'isotype IgG2a (LG112) à 40 nM ; dans la cellule du ligand on immobilise dans les mêmes conditions le CD40 recombinant associé à la partie constante de la chaîne lourde d'IgG2a de souris (human CD40 muIg fusion protein, ANCELL Corporation, Bayport, MN).

Sur les deux cellules (référence et ligand) sont ensuite injectés, comme analyte, le CD40L (human CD154 muCD8 fusion protein, ANCELL Corporation) à différentes concentrations ou le CD40L à une concentration de 1  $\mu\text{M}$  ou de 125 nM, en présence de différents concentrations de ligands. Le flux en présence des analytes est de 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  pendant 5 minutes pour étudier l'association et, en absence d'analytes, les conditions sont les mêmes pour étudier la dissociation.

Afin de régénérer les cellules (c'est-à-dire enlever toutes les protéines adsorbées de manière non covalente), une solution de 10 mM de HCl est injectée à 5  $\mu\text{L}/\text{min}$  durant 1 minute. Les cellules sont ensuite prêtes pour une nouvelle analyse.

### Résultats

Afin d'étudier la constante d'affinité du CD40L pour le CD40, on utilise 4 concentrations de CD40L de 62,5 jusqu'à 500 nM. La constante d'équilibre est calculée à 54 nM.

Pour étudier l'association avec L1, l'analyte était constitué de CD40L à 1  $\mu\text{M}$  et de L1 à 50  $\mu\text{M}$ . Bien qu'une inhibition soit observée durant les premières secondes de l'interaction, elle disparaît au cours des cinq minutes d'association, rendant impossible le calcul de la constante d'équilibre de L1. Celle-ci est donc plus grande que 50  $\mu\text{M}$ .

L'association de L3 fut étudiée en présence de 125 nM de CD40L. L'analyse cinétique en présence de 2,5  $\mu\text{M}$  de L3 a donné une constante d'équilibre pour L3 de 10  $\mu\text{M}$ .

L'association de L4 fut étudiée en présence de 100 nM de CD40L. L'analyse cinétique en présence de 40 et 80 nM de L4 donnait une constante d'équilibre pour L4 de 180 nM.

5

## II - TESTS DES LIGANDS DANS DES MODÈLES *IN VITRO* :

10

15

20

25

30

Les cellules dendritiques immatures, différenciées *in vitro* à partir de monocytes humains, sont très sensibles au CD40L qui induit leur maturation. Cette maturation s'accompagne (i) de profonds remaniements phénotypiques, (ii) d'une sécrétion de cytokines et de chimiokines, (iii) d'une résistance à l'apoptose médiée par le CD95 (Koppi et al., 1997 ; Bjorck et al., 1997), (iv) d'une longévité accrue des cellules dendritiques (Miga et al., 1997) et (v) d'une capacité nettement accrue des cellules dendritiques matures à stimuler des lymphocytes T allogéniques. On étudie l'effet de ces ligands sur les CDs. On étudie en premier lieu, par cytométrie en flux, la capacité des ligands agonistes potentiels à modifier le phénotype des CDs immatures. On poursuit cette étude en cherchant à mettre en évidence, à l'aide de tests ELISA, le déclenchement par les ligands agonistes d'une sécrétion de cytokines. Enfin, cette recherche est complétée par l'étude de la capacité des CDs, préincubées en présence des molécules agonistes, à stimuler des cellules T allogéniques. L'effet des ligands antagonistes est évalué par la mesure de la diminution des variations, normalement induites par le CD40L, observée en préincubant les CDs en présence des molécules antagonistes. L'effet des ligands peut aussi être testé (i) sur la commutation de classes des lymphocytes B, qui peut être mimée *in vitro* par activation de cellules B des amygdales par CD40 en présence de cytokines, et (ii) sur la différenciation des lymphocytes T cytotoxiques qui peut être mimée par une co-incubation de cellules dendritiques activées par CD40 et des cellules T pré-cytotoxiques.

# RÉFÉRENCES

- Bjorck, P., Banchereau, J., Flores-Romo, L. (1997) CD40 ligation counteracts Fas-induced apoptosis of human dendritic cells, *Int Immunol.*, **9**: 365-72,
- 5    – Buelens, C., Verhasselt, V., De Groote, D., Goldman, M., Willems, F. (1997) Human dendritic cell responses to lipopolysaccharide and CD40 ligation are differentially regulated by interleukin-10, *Eur J Immunol.*, **27**: 1848-52,
- Chaussabel, D., Jacobs, F., de Jonge, J., de Veerman, M., Carlier, Y., Thielemans, K., Goldman, M., Vray, B. (1999) CD40 ligation prevents *Trypanosoma cruzi* infection through interleukin-12 upregulation, *Infect Immun.*, **67**: 1929-34,
- 10   – Diehl, L., den Boer, A.T., Schoenberger, S.P., van der Voort, E.I., Schumacher, T.N., Melief, C.J., Offringa, R., Toes, R.E. (1999) CD40 activation *in vivo* overcomes peptide-induced peripheral cytotoxic T-lymphocyte tolerance and augments anti-tumor vaccine efficacy, *Nat Med.*, **5**: 774-9,
- 15   – Howard, L.M., Miga, A.J., Vanderlugt, C.L., Dal Canto, M.C., Laman, J.D., Noelle, R.J., Miller, S.D. (1999) Mechanisms of immunotherapeutic intervention by anti-CD40L (CD154) antibody in an animal model of multiple sclerosis, *J Clin Invest.*, **103**: 281-90,
- Kaiser, E. et coll. (1970) *Anal. Biochem.*, **34**, 595-598,
- 20   – Kikuchi, T., Moore, M.A., Crystal, R.G. (2000) Dendritic cells modified to express CD40 ligand elicit therapeutic immunity against preexisting murine tumors, *Blood*. **96**: 91-9,
- Kirk, A.D., Burkly, L.C., Batty, D.S., Baumgartner, R.E., Berning, J.D., Buchanan, K., Fechner, J.H., Jr., Germond, R.L., Kampen, R.L., Patterson, N.B., Swanson, S.J., Tadaki, D.K., TenHoor, C.N., White, L., Knechtle, S.J., Harlan, D.M. (1999) Treatment with humanized monoclonal antibody against CD154 prevents acute renal allograft rejection in non-human primates, *Nat Med.*, **5**: 686-93,
- 25   – Koppi, T.A., Tough-Bement, T., Lewinsohn, D.M., Lynch, D.H., Alderson, M.R. (1997) CD40 ligand inhibits Fas/CD95-mediated apoptosis of human blood-derived dendritic cells, *Eur J Immunol.*, **27**: 3161-5,
- 30   – Lode, H.N., Xiang, R., Pertl, U., Forster, E., Schoenberger, S.P., Gillies, S.D., Reisfeld, R.A. (2000) Melanoma immunotherapy by targeted IL-2 depends on CD4(+) T-cell help mediated by CD40/CD40L interaction, *J Clin Invest.*, **105**: 1623-30,

- Miga, A.J., Masters, S.R., Durell, B.G., Gonzalez, M., Jenkins, M.K., Maliszewski, C., Kikutani, H., Wade, W.F., Noelle, R.J. (2001) Dendritic cell longevity and T cell persistence is controlled by CD154-CD40 interactions, *Eur J Immunol.*, 31: 959-965,
- Schattner, E.J., Mascarenhas, J., Bishop, J., Yoo, D.H., Chadburn, A., Crow, M.K., Friedman, S.M. (1996) CD4<sup>+</sup> T-cell induction of Fas-mediated apoptosis in Burkitt's lymphoma B cells, *Blood*, 88: 1375-82,
- Sotomayor, E.M., Borrello, I., Tubb, E., Rattis, F.M., Bien, H., Lu, Z., Fein, S., Schoenberger, S., Levitsky, H.I. (1999) Conversion of tumor-specific CD4<sup>+</sup> T-cell tolerance to T-cell priming through *in vivo* ligation of CD40. *Nat Med.*, 5: 780-7.



# REVENDICATIONS

1. Molécule multimérique capable de mimer, avec une activité agoniste ou antagoniste, un ligand multimérique protéique naturel.

2. Molécule multimérique selon la revendication 1, le ligand étant un ligand de récepteur de la superfamille du TNF.

3. Molécule multimérique selon la revendication 2, le ligand étant un ligand de la molécule CD40.

4. Molécule multimérique selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle répond à la formule générale suivante :



dans laquelle :

- n est égal à 3, 4, 5 ou 6,
- A est un groupe chimique, fonctionnalisé par au moins trois fonctions amines ou fonctions COOH,

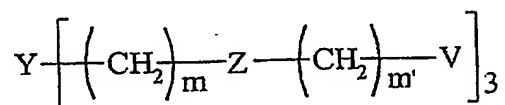
- X représente un groupe D, B-D ou B(D)-D', dans lequel :

- \* B est un bras espaceur,
- \* D et D' sont des peptides ou pseudopeptides correspondant à une séquence dérivée du ligand, choisie parmi les résidus formant l'interface avec le récepteur du ligand, laquelle est susceptible d'interagir avec le récepteur.

5. Molécule multimérique selon la revendication 4, caractérisée en ce que A présente une symétrie C<sub>3</sub>.

6. Molécule multimérique selon la revendication 4, caractérisée en ce que :

- soit A est un radical branché de symétrie C<sub>3</sub> de formule générale suivante :



## REVENDEICATIONS

1. Molécule multimérique, caractérisée en ce qu'elle répond à la formule générale suivante :



dans laquelle :

— n est égal à 3, 4, 5 ou 6,

— A est un groupe chimique, fonctionnalisé par au moins trois fonctions amines ou fonctions COOH,

— X représente un groupe -D, -B-D ou -B(D)-D', dans lequel :

\* B est un bras espaceur,

\* -D et -D' représentent des peptides dérivés du ligand du récepteur CD40 humain ou murin (CD40L), lesdits peptides appartenant à la séquence primaire du ligand CD40L de CD40 et dont le nombre d'acides aminés est compris entre 3 et 10.

2. Molécule selon la revendication 1, caractérisée en ce que les peptides dérivés du ligand du récepteur CD40 humain ou murin (CD40L) sont choisis parmi les suivants :

Lys<sup>143</sup>-Gly-Tyr<sup>145</sup>, Tyr<sup>145</sup>-Gly-Lys<sup>143</sup>, Lys<sup>143</sup>-Gly-Tyr-Tyr<sup>146</sup>,

Tyr<sup>146</sup>-Tyr-Gly-Lys<sup>143</sup>,

Lys-Pro-Arg, H-Lys-ψ(CH<sub>2</sub>NH)Pro-Arg,

Arg<sup>200</sup>-Phe-Glu-Arg-Ile-Leu-Leu-Arg<sup>207</sup>,

Arg<sup>207</sup>-Leu-Leu-Ile-Arg-Glu-Phe-Arg<sup>200</sup>,

Arg<sup>200</sup>-Phe-Glu-Arg-Ile<sup>204</sup>, Ile<sup>204</sup>-Arg-Glu-Phe-Arg<sup>200</sup>,

Arg<sup>203</sup>-Ile-Leu-Leu-Arg<sup>207</sup>, Arg<sup>207</sup>-Leu-Leu-Ile-Arg<sup>203</sup>,

Cys<sup>218</sup>-Gly-Gln-Gln-Ser-Ile<sup>223</sup>, Ile<sup>223</sup>-Ser-Gln-Gln-Gly-Cys<sup>218</sup>,

Gly<sup>200</sup>-Ser-Glu-Arg-Ile-Leu-Leu-Lys<sup>207</sup>,

Lys<sup>207</sup>-Leu-Leu-Ile-Arg-Glu-Ser-Gly<sup>200</sup>,

Gly<sup>200</sup>-Ser-Glu-Arg-Ile<sup>204</sup>, Ile<sup>204</sup>-Arg-Glu-Ser-Gly<sup>200</sup>,

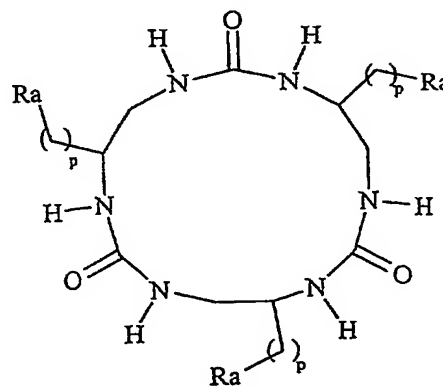
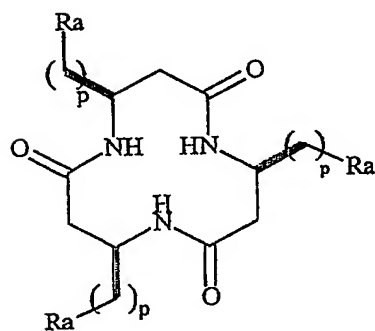
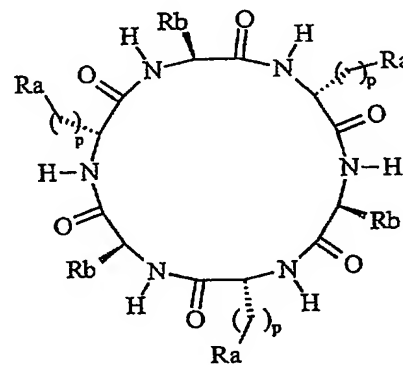
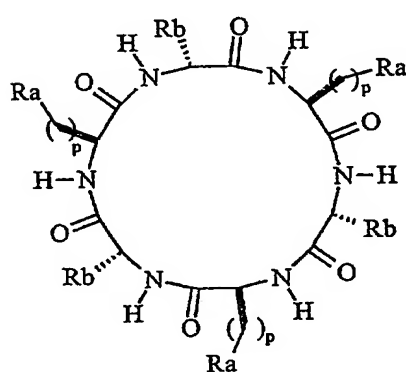
Arg<sup>203</sup>-Ile-Leu-Leu-Lys<sup>207</sup>, Lys<sup>207</sup>-Leu-Leu-Ile-Arg<sup>203</sup>,

Cys<sup>218</sup>-Glu-Gln-Gln-Ser-Val<sup>223</sup>, Val<sup>223</sup>-Ser-Gln-Gln-Glu-Cys<sup>218</sup>,

dans laquelle :

- \* m et m' sont des nombres entiers compris de 1 à 5,
- \* V représente un groupe NH ou CO formant une liaison amide avec X,
- \* Z représente un atome d'oxygène ou un groupe CH<sub>2</sub>,
- \* Y représente soit un atome d'azote, soit un groupe R-C soit un groupe R-CONH-C, dans lesquels R peut être un groupe alkyle avec 1 à 10 atomes de carbone, un groupe alkényle avec 1 à 10 atomes de carbone, un groupe alkynyle avec 1 à 10 atomes de carbone, un groupe aryle avec 5 à 12 atomes de carbone, un groupe aralkyle avec 5 à 14 atomes de carbone ou un groupe hétéroaryle avec 1 à 10 atomes de carbone, lesdits groupes pouvant être non substitués ou substitués par 1 jusqu'à 6 substituants choisis parmi les groupes COOH, NH<sub>2</sub>, CONH<sub>2</sub> ou alkoxy,

- soit A est un radical C<sub>3</sub> cyclique répondant à l'une des formules générales suivantes :



ou parmi des peptides hybrides constitués d'au moins deux acides aminés consécutifs de deux des séquences définies ci-dessus, notamment les peptides de séquences Arg<sup>203</sup>-Ile<sup>204</sup>-Tyr<sup>145</sup>-Tyr<sup>146</sup> ou Arg<sup>203</sup>-Ile<sup>204</sup>-Tyr<sup>146</sup>-Tyr<sup>145</sup>-Gly<sup>144</sup>-Lys<sup>143</sup>,

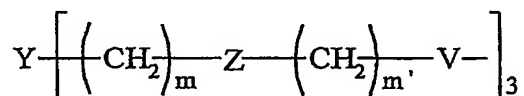
ou parmi des fragments des séquences susmentionnées,

les acides aminés pouvant être indifféremment de configuration L ou D.

3. Molécule multimérique selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que A présente une symétrie C<sub>3</sub>.

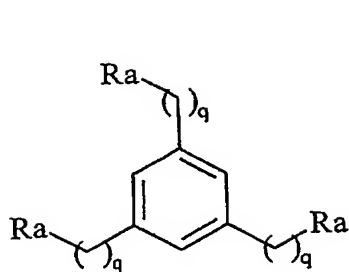
4. Molécule multimérique selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que :

- soit A est un radical branché de symétrie C<sub>3</sub> de formule générale suivante :

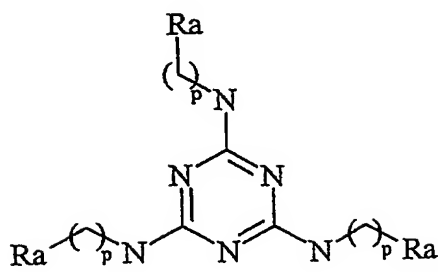


dans laquelle :

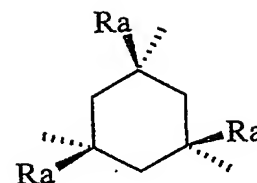
- \* m et m' sont des nombres entiers compris de 1 à 5,
- \* V représente un groupe -NH- ou -CO- formant une liaison amide avec X,
- \* Z représente un atome d'oxygène ou un groupe CH<sub>2</sub>,
- \* Y représente soit un atome d'azote, soit un groupe R-C- soit un groupe R-CONH-C-, dans lesquels R peut être un groupe alkyle avec 1 à 10 atomes de carbone, un groupe alkényle avec 1 à 10 atomes de carbone, un groupe alkynyle avec 1 à 10 atomes de carbone, un groupe aryle avec 5 à 12 atomes de carbone, un groupe aralkyle avec 5 à 14 atomes de carbone ou un groupe hétéroaryle avec 1 à 10 atomes de carbone, lesdits groupes pouvant être non substitués ou substitués par 1 jusqu'à 6 substituants choisis parmi les groupes -COOH, -NH<sub>2</sub>, -CONH<sub>2</sub> ou alkoxy,



IV



V

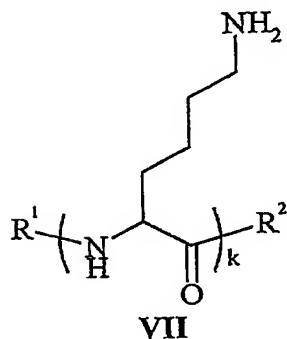


VI

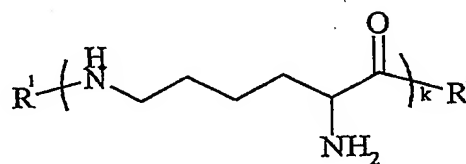
dans lesquelles :

- \*  $R_a$  représente soit un groupe NH soit un groupe CO formant une liaison amide avec X,
- \*  $R_b$  représente la chaîne latérale d'un acide aminé protéinogénique,
- \*  $p$  est un nombre entier compris de 1 à 4,
- \*  $q$  est un nombre entier compris de 0 à 4,

- soit A est un radical branché non symétrique répondant aux formules générales suivantes :



VII

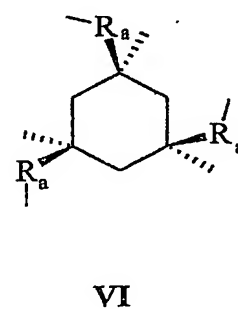
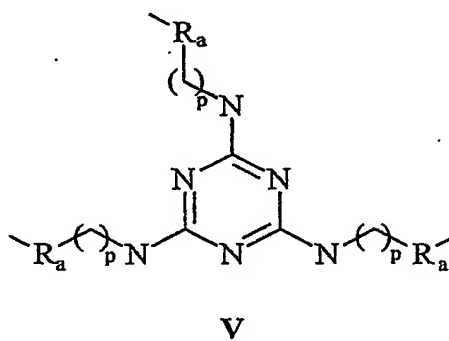
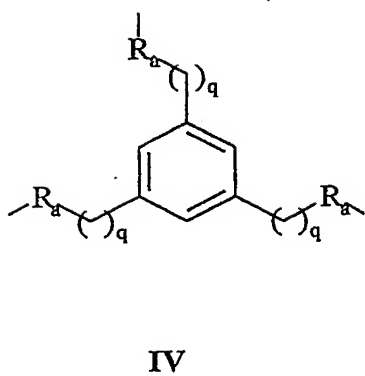
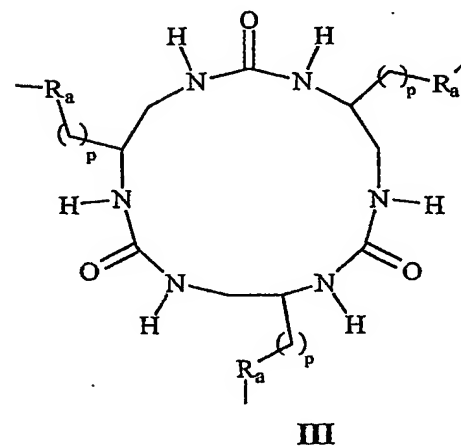
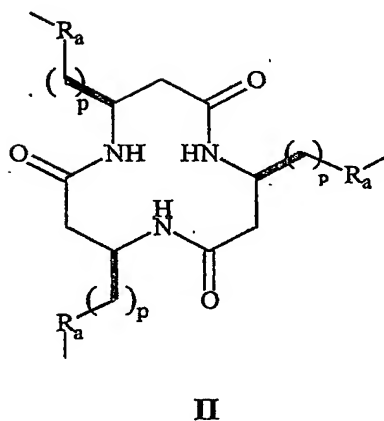
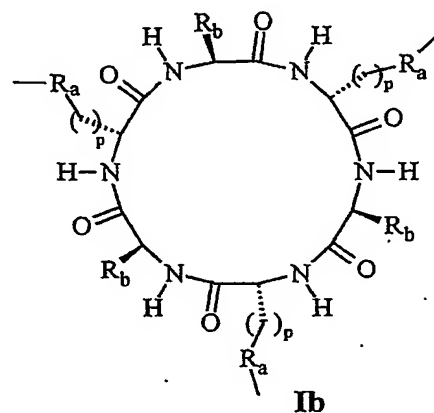
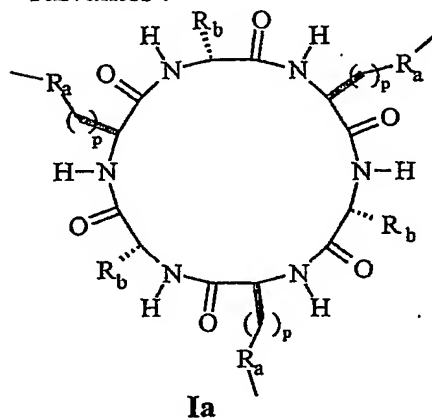


VIII

dans lesquelles :

- \*  $k$  représente 3, 4, 5 ou 6,
- \*  $R^1$  représente soit un atome d'hydrogène, soit un résidu d'acide aminé choisi parmi les acides aminés protéinogéniques, soit un groupement RCO, ROCO ou RNHCO, R étant tel que défini ci-dessus,
- \*  $R^2$  représente soit un groupe  $NH_2$ , soit un groupe NHR, soit un résidu d'acide aminé choisi parmi les acides aminés protéinogéniques, R étant tel que défini ci-dessus,

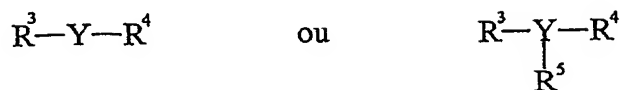
- soit A est un radical C<sub>3</sub> cyclique répondant à l'une des formules générales suivantes :



dans lesquelles :

- \* R<sub>a</sub> représente soit un groupe -NH- soit un groupe -CO- formant une liaison amide avec X,
- \* R<sub>b</sub> représente la chaîne latérale d'un acide aminé protéinogénique,
- \* p est un nombre entier compris de 1 à 4,

- B répond à l'une des formules générales suivantes :



dans lesquelles :

- \* Y représente une chaîne alkyle C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> ou un groupement alkynyle ou alkényle ou aryle ou aralkyle ou hétéroaryle,
- \* R<sup>3</sup> représente soit un groupe -NH lorsque V ou R<sub>a</sub> est un groupe CO, soit un groupe CO lorsque V ou R<sub>a</sub> est un groupe -NH,
- \* R<sup>4</sup> et R<sup>5</sup> représentent indépendamment l'un de l'autre un groupe CO ou un groupe NH,

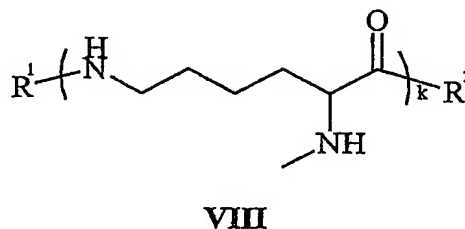
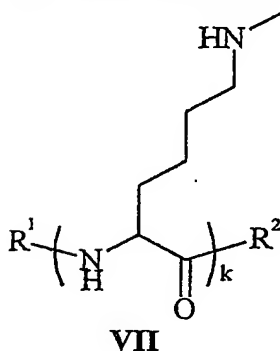
- D et D' sont des peptides ou pseudopeptides correspondant à une séquence dérivée du ligand qui est en interaction avec le récepteur.

7. Molécule selon l'une des revendications 4 à 6, caractérisée en ce que D et D' représentent des résidus dérivés du ligand du récepteur CD40 humain ou murin (CD40L), choisis parmi les suivants :

Lys<sup>143</sup>-Gly-Tyr<sup>145</sup>, Tyr<sup>145</sup>-Gly-Lys<sup>143</sup>, Lys<sup>143</sup>-Gly-Tyr-Tyr<sup>146</sup>,  
 Tyr<sup>146</sup>-Tyr-Gly-Lys<sup>143</sup>,  
 Lys-Pro-Arg, H-Lys-ψ(CH<sub>2</sub>NH)Pro-Arg,  
 Arg<sup>200</sup>-Phe-Glu-Arg-Ile-Leu-Leu-Arg<sup>207</sup>,  
 Arg<sup>207</sup>-Leu-Leu-Ile-Arg-Glu-Phe-Arg<sup>200</sup>,  
 Arg<sup>200</sup>-Phe-Glu-Arg-Ile<sup>204</sup>, Ile<sup>204</sup>-Arg-Glu-Phe-Arg<sup>200</sup>,  
 Arg<sup>203</sup>-Ile-Leu-Leu-Arg<sup>207</sup>, Arg<sup>207</sup>-Leu-Leu-Ile-Arg<sup>203</sup>,  
 Cys<sup>218</sup>-Gly-Gln-Gln-Ser-Ile<sup>223</sup>, Ile<sup>223</sup>-Ser-Gln-Gln-Gly-Cys<sup>218</sup>,  
 Gly<sup>200</sup>-Ser-Glu-Arg-Ile-Leu-Leu-Lys<sup>207</sup>,  
 Lys<sup>207</sup>-Leu-Leu-Ile-Arg-Glu-Ser-Gly<sup>200</sup>,  
 Gly<sup>200</sup>-Ser-Glu-Arg-Ile<sup>204</sup>, Ile<sup>204</sup>-Arg-Glu-Ser-Gly<sup>200</sup>,  
 Arg<sup>203</sup>-Ile-Leu-Leu-Lys<sup>207</sup>, Lys<sup>207</sup>-Leu-Leu-Ile-Arg<sup>203</sup>,  
 Cys<sup>218</sup>-Glu-Gln-Gln-Ser-Val<sup>223</sup>, Val<sup>223</sup>-Ser-Gln-Gln-Glu-Cys<sup>218</sup>,

\* q est un nombre entier compris de 0 à 4,

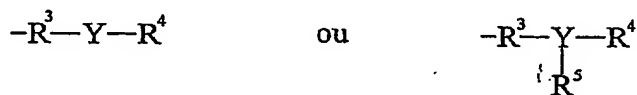
- soit A est un radical branché non symétrique répondant aux formules générales suivantes :



dans lesquelles :

- \* k représente 3, 4, 5 ou 6,
- \* R¹ représente soit un atome d'hydrogène, soit un résidu d'acide aminé choisi parmi les acides aminés protéinogéniques, soit un groupement RCO-, ROCO- ou RNHCO-, R étant tel que défini ci-dessus,
- \* R² représente soit un groupe -NH₂, soit un groupe -NHR, soit un résidu d'acide aminé choisi parmi les acides aminés protéinogéniques, R étant tel que défini ci-dessus,

— B répond à l'une des formules générales suivantes :



dans lesquelles :

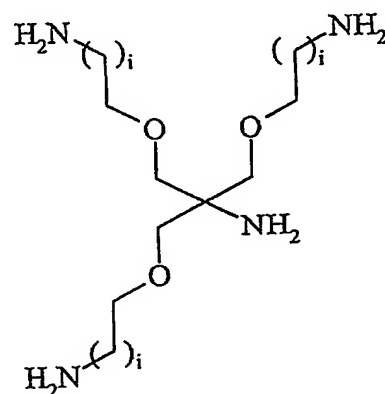
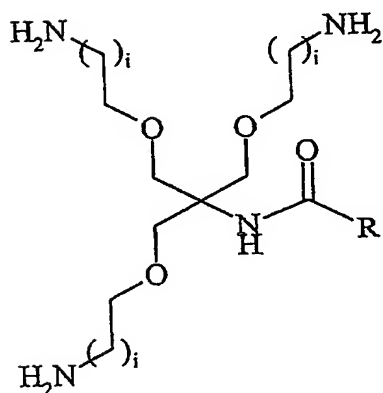
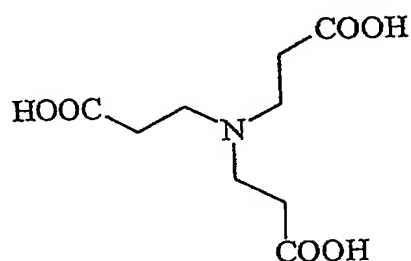
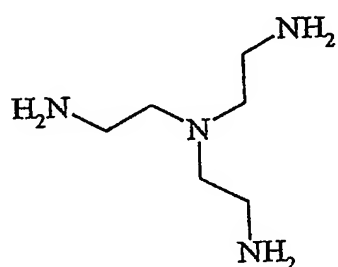
- \* Y représente une chaîne alkyle C₁-C₁₀ ou un groupement alkynyle ou alkényle ou aryle ou aralkyle ou hétéroaryle,
  - \* R³ représente soit un groupe -NH- lorsque V ou Rₐ est un groupe -CO-, soit un groupe -CO- lorsque V ou Rₐ est un groupe -NH-,
  - \* R⁴ et R⁵ représentent indépendamment l'un de l'autre un groupe -CO- ou un groupe -NH-,
- -D et -D' sont des peptides ou pseudopeptides tels que définis dans la revendication 1 ou 2.



ou parmi des peptides hybrides constitués d'au moins deux acides aminés consécutifs de deux des séquences définies ci-dessus, notamment les peptides de séquences Arg<sup>203</sup>-Ile<sup>204</sup>-Tyr<sup>145</sup>-Tyr<sup>146</sup> ou Arg<sup>203</sup>-Ile<sup>204</sup>-Tyr<sup>146</sup>-Tyr<sup>145</sup>-Gly<sup>144</sup>-Lys<sup>143</sup>,

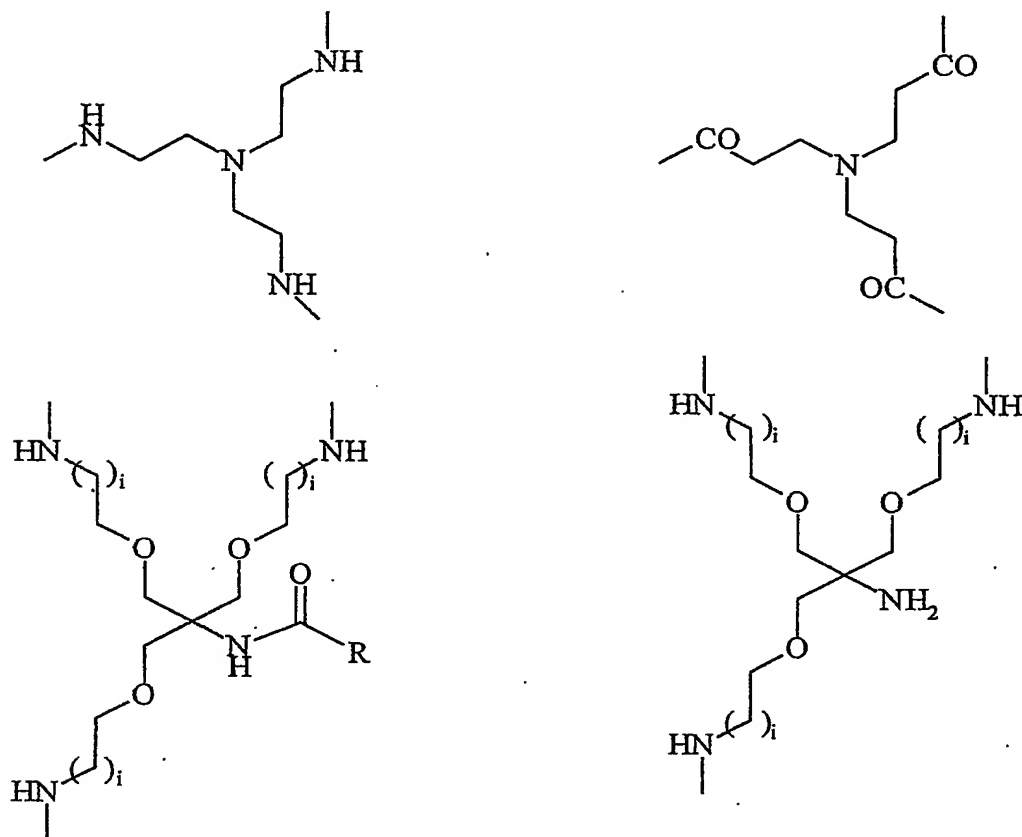
5 ou parmi des fragments des séquences susmentionnées,  
les acides aminés pouvant être indifféremment de configuration L ou D.

10 8. Molécule selon l'une des revendications 4 à 7, caractérisée en ce que A  
répond à l'une des formules suivantes :



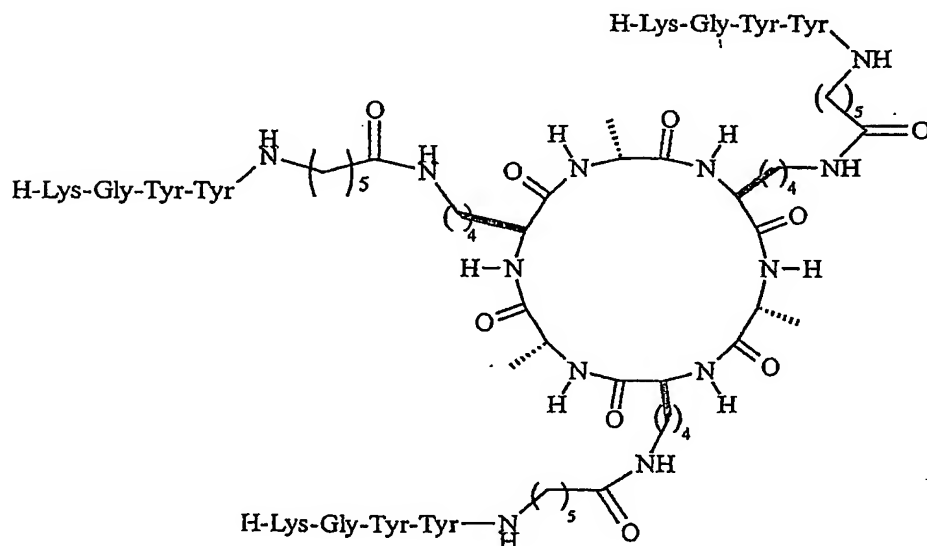
dans lesquelles i représente un nombre entier supérieur ou égal à 1.

5. Molécule selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que A répond à l'une des formules suivantes :

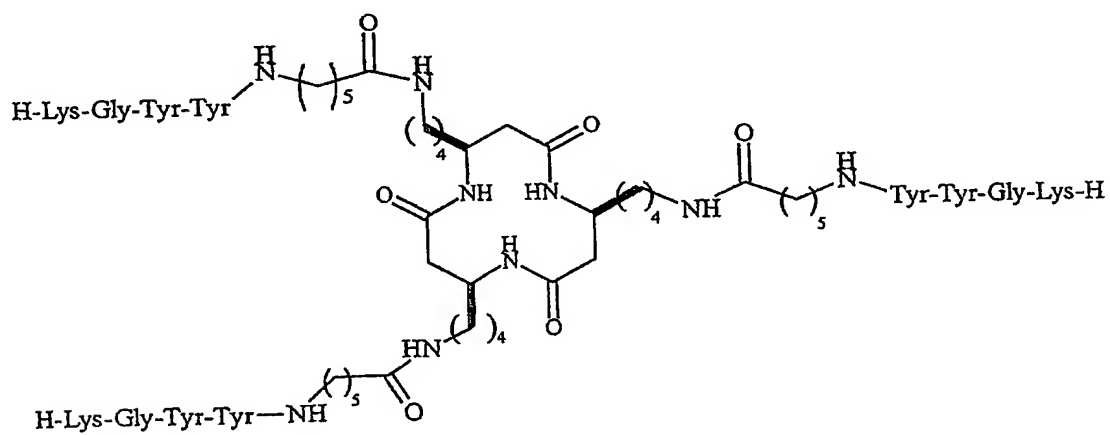
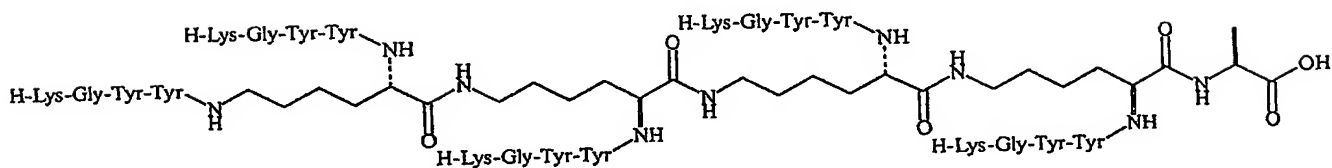
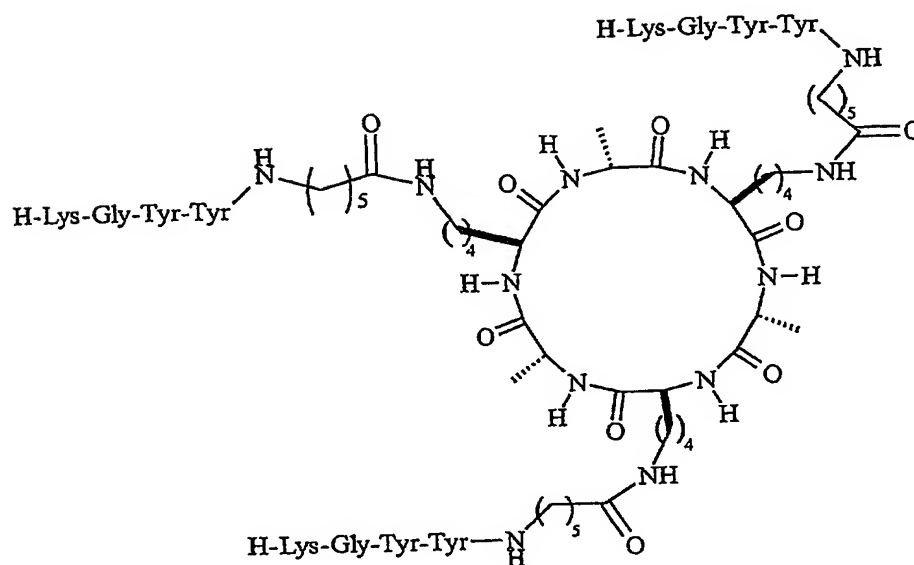


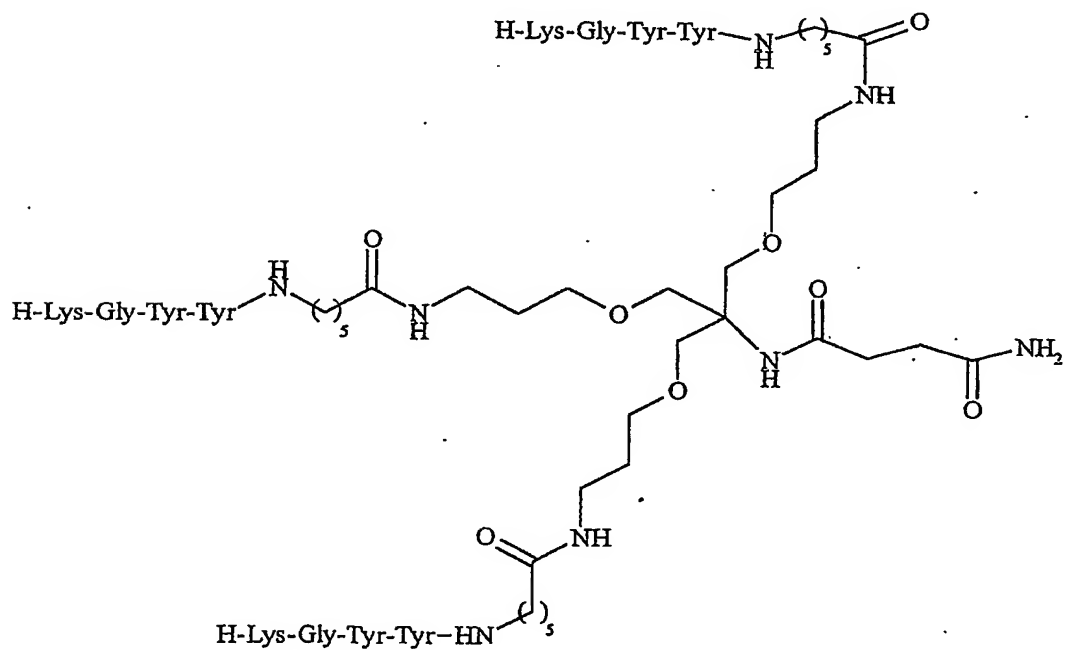
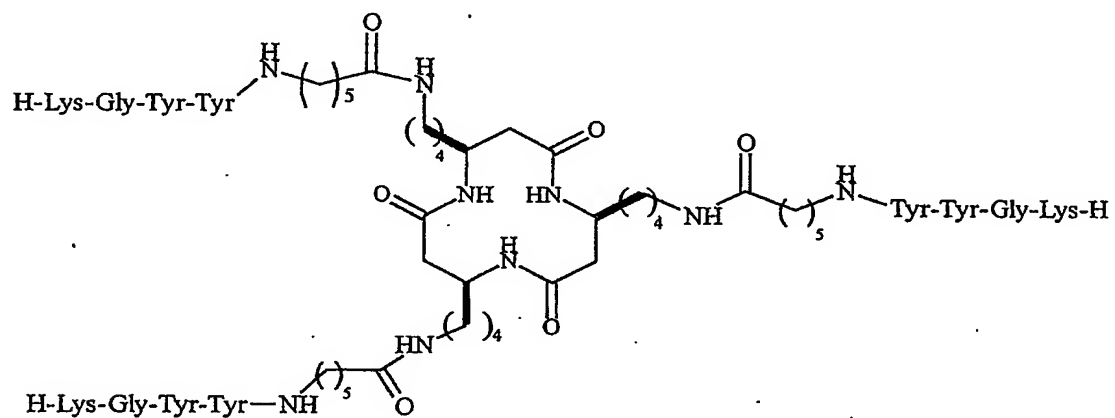
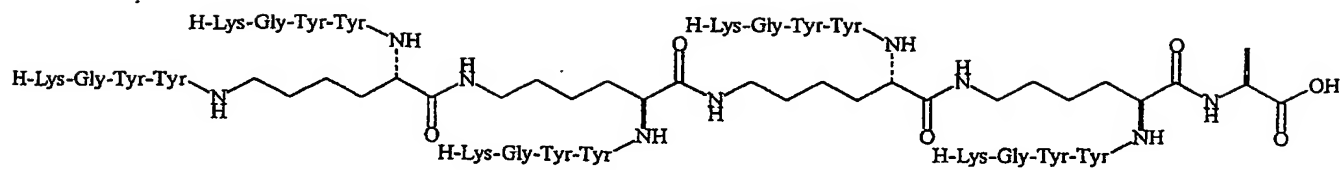
dans lesquelles i représente un nombre entier supérieur ou égal à 1.

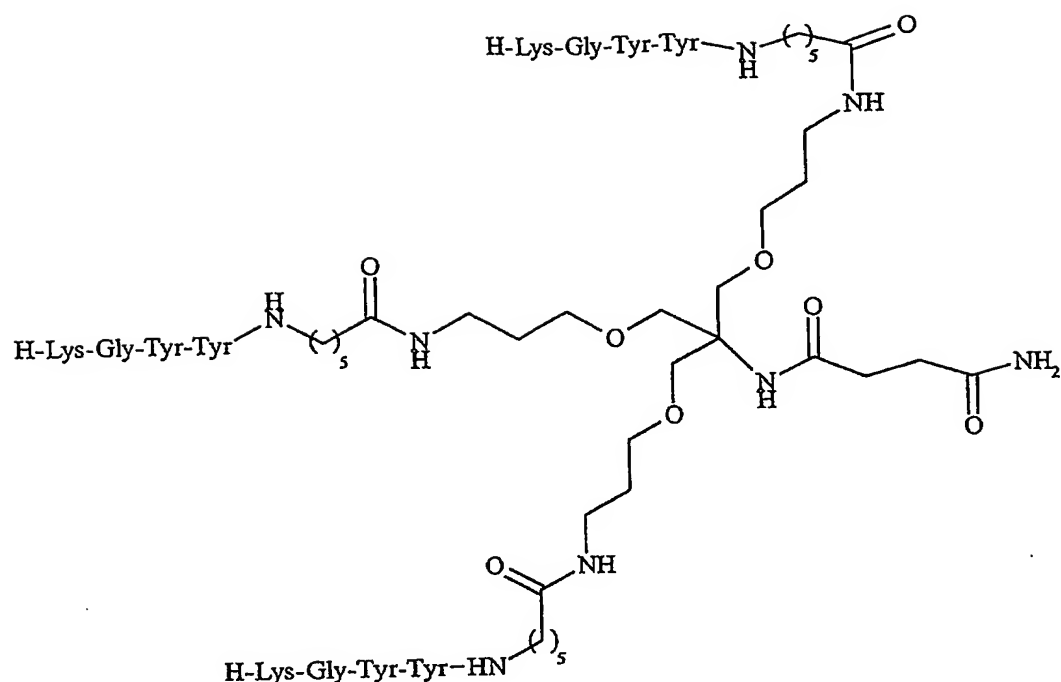
6. Molécule selon l'une des revendications 1 à 5, de formule suivante :



9. Molécule selon l'une des revendications 4 à 8, de formule suivante :







10. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend, à titre de substance active une molécule multimérique selon l'une des revendications 1 à 9, en association avec un vecteur pharmaceutiquement acceptable.

11. Composition vaccinale, caractérisée en ce qu'elle comprend, à titre de substance active une molécule multimérique selon l'une des revendications 1 à 9, en association avec un adjuvant pharmaceutiquement acceptable.

12. Utilisation de molécules multimériques selon l'une des revendications 1 à 9, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies impliquant l'inhibition ou l'activation de la réponse immunitaire.

13. Utilisation selon la revendication 12, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies impliquant l'inhibition de la réponse immunitaire, telles que les rejets de greffes ou les maladies auto-immunes.

14. Utilisation selon la revendication 12, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies impliquant l'augmentation de la réponse immunitaire, telles que les cancers ou les infections parasitaires, bactériennes ou virales.

7. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend, à titre de substance active une molécule multimérique selon l'une des revendications 1 à 6, en association avec un vecteur pharmaceutiquement acceptable.

5 8. Composition vaccinale, caractérisée en ce qu'elle comprend, à titre de substance active une molécule multimérique selon l'une des revendications 1 à 6, en association avec un adjuvant pharmaceutiquement acceptable.

10 9. Utilisation de molécules multimériques selon l'une des revendications 1 à 6, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies impliquant l'inhibition ou l'activation de la réponse immunitaire.

15 10. Utilisation selon la revendication 9, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies impliquant l'inhibition de la réponse immunitaire, telles que les rejets de greffes ou les maladies auto-immunes.

20 11. Utilisation selon la revendication 9, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies impliquant l'augmentation de la réponse immunitaire, telles que les cancers ou les infections parasitaires, bactériennes ou virales.

25 12. Procédé de préparation sur support solide d'une molécule multimérique, selon l'une des revendications 1 à 6, dans laquelle A est un radical  $C_3$  cyclique et répond à l'une des formules Ia, Ib ou II telles que définies dans la revendication 4, ledit procédé étant caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

30 — la formation d'un précurseur linéaire de A, lequel précurseur est constitué d'un enchaînement d'acides aminés formant une chaîne peptidique en croissance, synthétisée par des cycles successifs de couplage entre des résidus d'acides aminés N-protégés, dont trois portent un groupe  $R_a$  de type amine, et la fonction amine de la chaîne peptidique en croissance, et de déprotection, le premier résidu d'acide aminé étant accroché sur un support solide,

— la cyclisation du précurseur linéaire de A protégé susmentionné,  
— le clivage des susdits groupes protecteurs, pour libérer les susdites fonctions amines protégées,

15. Procédé de préparation sur support solide d'une molécule multimérique, selon l'une des revendications 4 à 9, dans laquelle A est un radical  $C_3$  cyclique et répond à l'une des formules Ia, Ib ou II telles que définies dans la revendication 6, ledit procédé étant caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- 5       – la formation d'un précurseur linéaire de A, lequel précurseur est constitué d'un enchaînement d'acides aminés formant une chaîne peptidique en croissance, synthétisée par des cycles successifs de couplage entre des résidus d'acides aminés N-protégés, dont trois portent un groupe  $R_a$  de type amine, et la fonction amine de la chaîne peptidique en croissance, et de déprotection, le premier résidu d'acide aminé étant
- 10       accroché sur un support solide,
  - la cyclisation du précurseur linéaire de A protégé susmentionné,
  - le clivage des susdits groupes protecteurs, pour libérer les susdites fonctions amines protégées,
  - le couplage des trois fonctions amines libérées avec un bras espaceur B
  - 15       N-protégé,
    - la déprotection du bras espaceur B et le couplage des fonctions amines libérées du bras espaceur B, avec un peptide D déjà formé ou formé in situ par l'assemblage séquentiel des résidus d'acides aminés correspondant au peptide D, et
    - le clivage de la molécule du support solide, après la suppression de tous les
    - 20       groupements protecteurs présents sur les chaînes latérales fonctionnalisées du peptide D, afin d'obtenir la molécule multimérique selon l'invention.

16. Procédé de préparation d'une molécule multimérique selon l'une des revendications 4 à 9, dans laquelle A est un radical  $C_3$  branché et répond à l'une des formules IV, V ou VI telles que définies dans la revendication 6, ledit procédé étant caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- 25       – le couplage des trois fonctions amines du radical A de formule IV, V ou VI avec un bras espaceur B protégé,
- la déprotection du bras espaceur B,
- 30       – l'assemblage du bras espaceur B déprotégé avec des acides aminés protégés entrant dans la constitution d'un peptide D, par des cycles successifs de couplage, de purification et de déprotection des acides aminés susmentionnés,
- la déprotection du dernier acide aminé entrant dans la constitution du peptide D, afin d'obtenir la molécule multimérique selon l'invention.

– le couplage des trois fonctions amines libérées avec un bras espaceur B N-protégé,

– la déprotection du bras espaceur B et le couplage des fonctions amines libérées du bras espaceur B, avec un peptide D déjà formé ou formé in situ par l'assemblage séquentiel des résidus d'acides aminés correspondant au peptide D, et

– le clivage de la molécule du support solide, après la suppression de tous les groupements protecteurs présents sur les chaînes latérales fonctionnalisées du peptide D, afin d'obtenir la molécule multimérique telle que définie dans l'une des revendications 1 à 6.

13. Procédé de préparation d'une molécule multimérique selon l'une des revendications 1 à 6, dans laquelle A est un radical  $C_3$  branché et répond à l'une des formules IV, V ou VI telles que définies dans la revendication 4, ledit procédé étant caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

– le couplage des trois fonctions amines du radical A de formule IV, V ou VI avec un bras espaceur B protégé,

– la déprotection du bras espaceur B,

– l'assemblage du bras espaceur B déprotégé avec des acides aminés protégés entrant dans la constitution d'un peptide D, par des cycles successifs de couplage, de purification et de déprotection des acides aminés susmentionnés,

– la déprotection du dernier acide aminé entrant dans la constitution du peptide D, afin d'obtenir la molécule multimérique telle que définie dans l'une des revendications 1 à 6.

14. Procédé de préparation sur support solide d'une molécule multimérique selon l'une des revendications 1 à 6, dans laquelle A est un radical branché non symétrique répondant à l'une des formules VII ou VIII telles que définies dans la revendication 4, ledit procédé étant caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

– le greffage d'une lysine sur un support solide, chacune des deux fonctions amines de la lysine, respectivement en position  $\alpha$  et  $\epsilon$ , étant protégée respectivement par des groupes protecteurs différents et orthogonaux,

– l'allongement de la chaîne peptidique formée à partir de la lysine, à la longueur désirée, par couplages et déprotections successifs.



17. Procédé de préparation sur support solide d'une molécule multimérique selon l'une des revendications 4 à 9, dans laquelle A est un radical branché non symétrique répondant à l'une des formules VII ou VIII telles que définies dans la revendication 6, ledit procédé étant caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

— le greffage d'une lysine sur un support solide, chacune des deux fonctions amines de la lysine, respectivement en position  $\alpha$  et  $\epsilon$ , étant protégée respectivement par des groupes protecteurs différents et orthogonaux,

— l'allongement de la chaîne peptidique formée à partir de la lysine, à la longueur désirée, par couplages et déprotections successifs

\* soit uniquement des fonctions amines en position  $\alpha$  afin d'obtenir le radical A de formule VII, avec des fonctions amines protégées en position  $\epsilon$ ,

\* soit uniquement des fonctions amines en position  $\epsilon$  afin d'obtenir le radical A de formule VIII, avec des fonctions amines protégées en position  $\alpha$ ,

— le couplage des fonctions amines déprotégées en position  $\epsilon$  dans le radical A de formule VII ou en position  $\alpha$  dans le radical A de formule VIII, avec un bras B protégé,

— l'assemblage du bras espaceur B déprotégé avec un peptide D déjà formé ou formé in situ par l'assemblage séquentiel des résidus d'acides aminés correspondant au peptide D, et

— le clivage de la molécule ainsi obtenue du support solide, après la suppression de tous les groupements protecteurs présents sur les chaînes latérales fonctionnalisées du peptide D.

\* soit uniquement des fonctions amines en position  $\alpha$  afin d'obtenir le radical A de formule VII, avec des fonctions amines protégées en position  $\epsilon$ ,

\* soit uniquement des fonctions amines en position  $\epsilon$  afin d'obtenir le radical A de formule VIII, avec des fonctions amines protégées en position  $\alpha$ ,

— le couplage des fonctions amines déprotégées en position  $\epsilon$  dans le radical A de formule VII ou en position  $\alpha$  dans le radical A de formule VIII, avec un bras B protégé,

— l'assemblage du bras espaceur B déprotégé avec un peptide D déjà formé ou formé in situ par l'assemblage séquentiel des résidus d'acides aminés correspondant au peptide D, et

— le clivage de la molécule ainsi obtenue du support solide, après la suppression de tous les groupements protecteurs présents sur les chaînes latérales fonctionnalisées du peptide D.

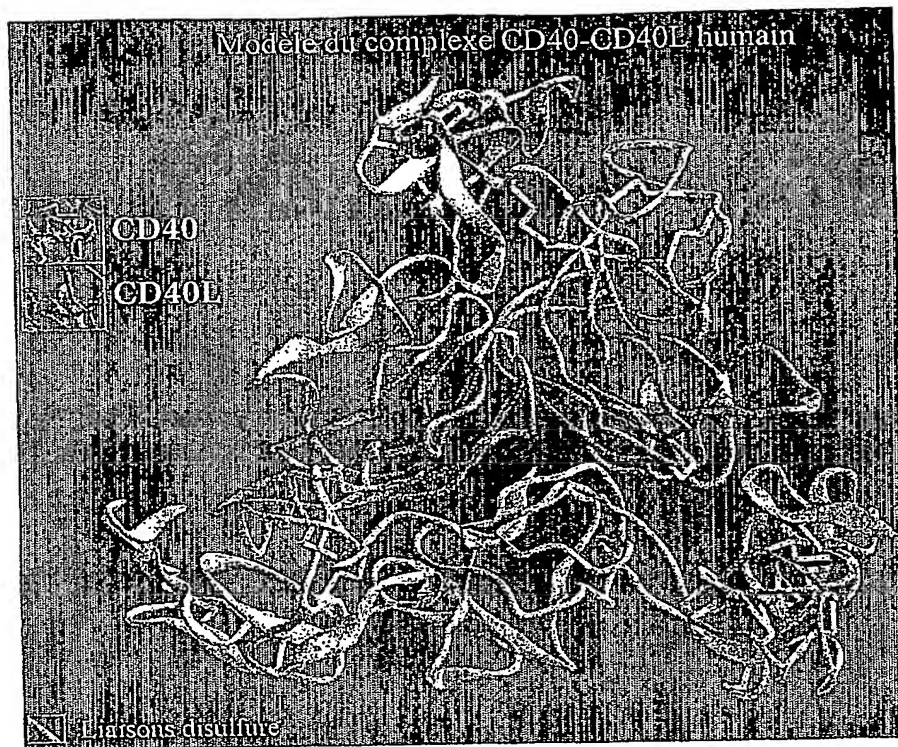


FIGURE 1A

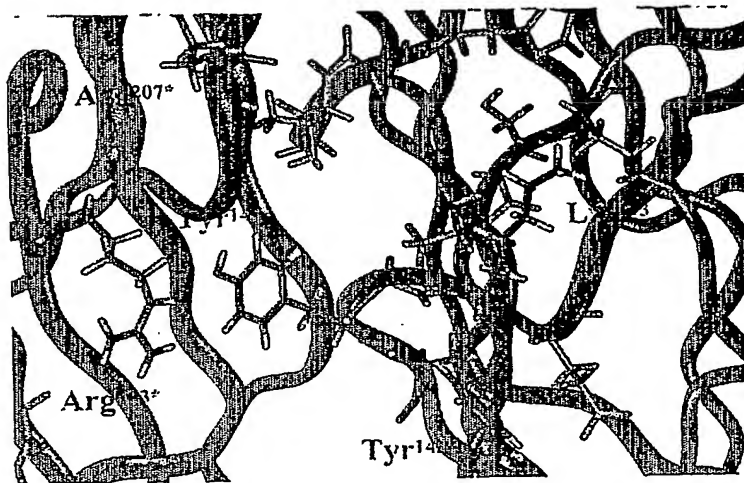


FIGURE 1B

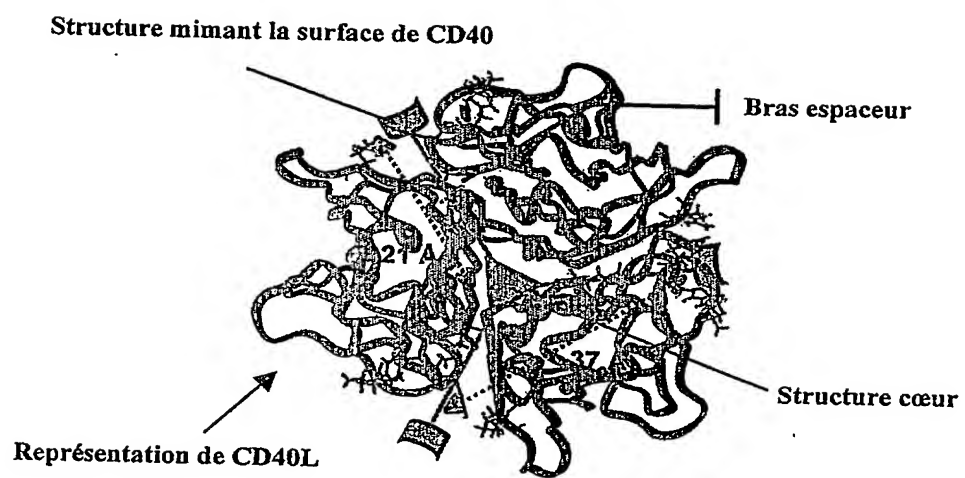


FIGURE 2

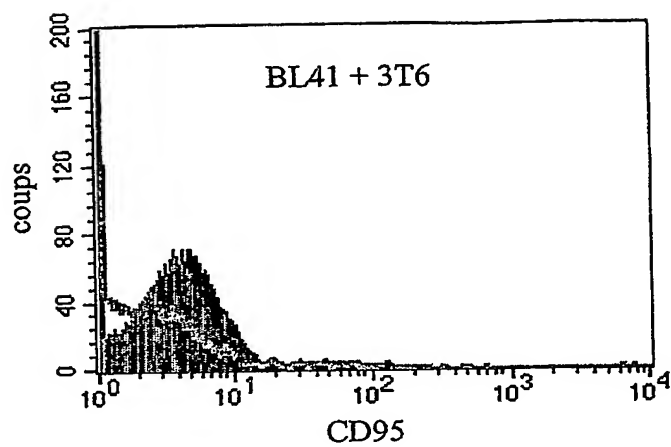


FIGURE 3A

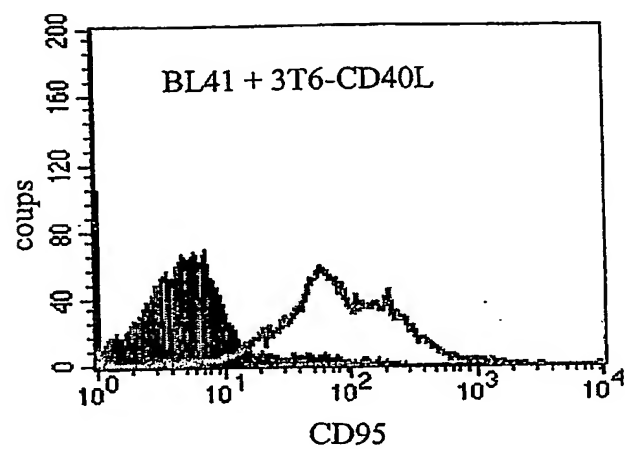


FIGURE 3B

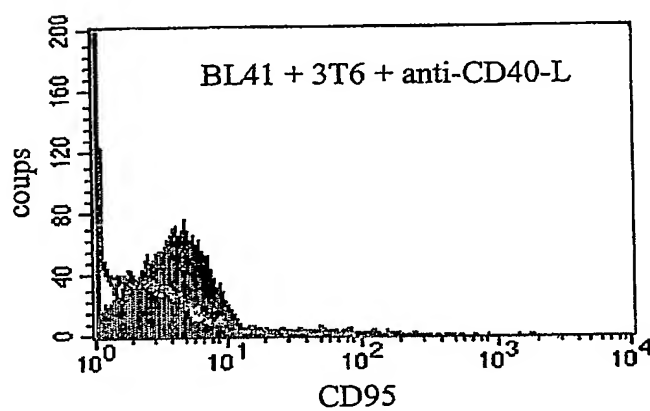


FIGURE 3C

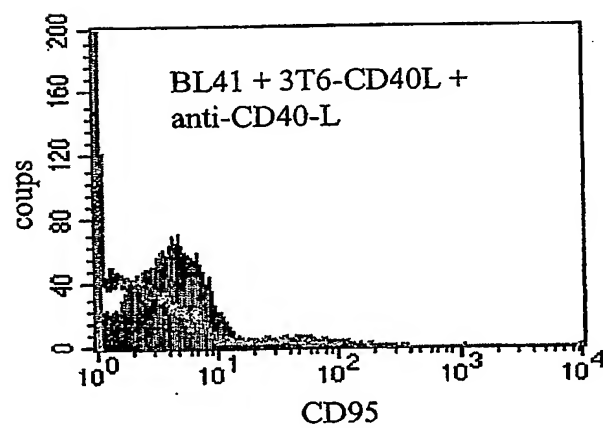


FIGURE 3D

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg

75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1. / 2.  
(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260399

Vos références pour ce dossier (facultatif)		IFB 02 AE CNR MULT	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		02/06631	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)			
NOUVELLES MOLECULES MULTIMERIQUES, LEUR PROCEDE DE PREPARATION, ET LEUR UTILISATION POUR LA PREPARATION DE MEDICAMENTS			
LE(S) DEMANDEUR(S) :			
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE 3, rue Michel-Ange F-75794 PARIS CEDEX 16, France			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1.» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		GUICHARD	
Prénoms		Gilles François Roger	
Adresse	Rue	La Louvière, 5, rue du Milieu	
	Code postal et ville	67202	WOLFISHEIM
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		FOURNEL	
Prénoms		Sylvie Victorine Lucienne	
Adresse	Rue	4, rue de Boston	
	Code postal et ville	67000	STRASBOURG
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		BIANCO	
Prénoms		Alberto	
Adresse	Rue	5, rue St Maurice	
	Code postal et ville	67000	STRASBOURG
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		Paris, le 8 juillet 2002  Chantal GROSSET-FOURNIER, Mandataire 422.5/PP112	

reçue le 15/07/02



**BREVET D'INVENTION**

**CERTIFICAT D'UTILITÉ**

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

N° 112

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg

75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 2 / 2.

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 1131

Vos références pour ce dossier (facultatif)		IFB 02 AE CNR MULT	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		02/06631	
<b>TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum)			
NOUVELLES MOLECULES MULTIMERIQUES, LEUR PROCEDE DE PREPARATION, ET LEUR UTILISATION POUR LA PREPARATION DE MEDICAMENTS			
<b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b>			
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE 3, rue Michel-Ange F-75794 PARIS CEDEX 16, France			
<b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :</b> (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		HOEBEKE	
Prénoms		Johan Félicien	
Adresse	Rue	21, rue de la Gare	
	Code postal et ville	67300	SCHILTIGHEIM
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		MULLER	
Prénoms		Sylviane	
Adresse	Rue	11, rue Beethoven	
	Code postal et ville	67000	STRASBOURG
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
<b>DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire)		Paris, le 8 juillet 2002  Chantal GROSSET-FOURNIER Mandataire 422.5/PP112	